

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MED. FERDINAND HOFSTÄDTER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchungen zur zellulären Antwort von BT474 und SK-BR-3
Mammakarzinomzelllinien auf die Behandlung mit den therapeutischen Antikörpern
Trastuzumab und Pertuzumab und die Rolle des PTEN-Proteins für das Ansprechen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von Carsten Schwab
aus Vilseck

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter

Tag der mündlichen Prüfung:

Professor Dr. Bernhard Weber

PD Dr. rer. nat. Gero Brockhoff

Prof. Dr. med. Frank Kullmann

26.04.2010

Meinen Eltern Reinhold & Monika Schwab in Dankbarkeit gewidmet

1 EINLEITUNG **1**

1.1 DAS MAMMAKARZINOM	2
1.1.1. Epidemiologie	2
1.1.2. Lokalisation	2
1.1.3. Ätiologie	2
1.1.4. Histopathologische Klassifikation	2
1.1.5. Tumorklassifikation	3
1.1.6. Pathogenese – molekulare Karzinogenese	5
1.2 DIE REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN DER C-ERBB-FAMILIE	5
1.2.1. Die Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	5
1.2.2. Die Subklasse der ErbB-Rezeptoren	6
1.2.3. Die Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren	9
1.2.4. Die Rolle der ErbB-Rezeptoren in der Tumorgenese des Mammakarzinoms	8
1.2.5. Die monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab in der Therapie des ErbB-2 expremierenden Mammakarzinoms	9
1.3 DIE ROLLE DES PTEN-PROTEINS AUF DAS ANSPRECHEN DER THERAPIE DES MAMMAKARZINOMS MIT TRASTUZUMAB (HERCEPTIN™)	12
1.4 NEUE THERAPIEANSÄTZE ZUR INHIBITION DER SIGNALWEGE DER ERBB- REZEPTOREN	13
1.5 ZIELSETZUNG	15

2 MATERIAL UND METHODEN **17**

2.1 ZELLKULTUR	17
2.1.1. Benutzte Zelllinien	17
2.1.2. Die Standardkultur	17
2.1.3. Stimulation mit Wachstumsfaktoren, mit Trastuzumab und Pertuzumab	18
2.2 PROTEINCHEMISCHE METHODEN	18
2.2.1. Herstellung von denaturierten Zellextrakten (Lysate)	19
2.2.2. Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein-Assay-Kit	20
2.2.3. Die Immunpräzipitation	21
2.2.4. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.2.5. Der Western-Blot	21
2.2.6. Der Nachweis der Proteine mittels Chemolumineszenz	22
2.2.7. Die Densitometrische Quantifizierung	23
2.2.8. Statistische Auswertung	23
2.3 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE	23
2.3.1. Der Zellzyklus	23
2.3.2. Zellgewinnung für die einparametrische DNA-Färbung	24
2.3.3. Das Durchflusszytometer FACSCalibur	24
2.3.4. Die Standardsoftware und die grafische Darstellung	25
2.4 IMMUNHISTOCHEMIE	26
2.4.1. Das Prinzip der Immunhistochemie	26
2.4.2. Die untersuchten Zelllinien	27
2.4.3. Die Gewinnung von Zellpellets aus der Zellkultur	27
2.4.4. Die Vorbereitung zur Antigendarstellung	28
2.4.5. Die Antigendarstellung und die Gegenfärbung	28
2.4.6. Die Konservierung der immunhistologischen Präparate	29
2.4.7. Die Mikrofotographie	29
2.5 MATERIALIEN	30
2.5.1. Medien und Zusätze für die Zellkultur	30
2.5.2. Antikörper	30
2.5.3. DNA-Farbstoffe, Enzyme und Wachstumsfaktoren	30
2.5.4. Gebrauchsfertig zusammengestellte Reagenzien (Kits)	31
2.5.5. Reagenzien und Chemikalien	31
2.5.6. Puffer und Lösungen	32
2.5.7. Verbrauchsmaterial	33
2.5.8. Geräte	33

3 ERGEBNISSE**35****3.1 SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT-UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOSPHORYLIERUNG DES C-ERBB2-REZEPTORS****35**

3.1.1. Die ErbB2-Phosphorylierung am Tyrosin 877

36

3.1.2. Die ErbB2-Phosphorylierung am Tyrosin 1248

38

3.2 STATISCHE ZELLZYKLUSANALYSE**40**

3.2.1. Die S-Phase-Fraktion von BT474 nach Antikörperbehandlung

40

3.2.2. Die S-Phase-Fraktion von SK-BR-3 nach Antikörperbehandlung

41

3.3 VERGLEICH DES PTEN-GEHALTS DER BEIDEN ZELLINIEN BT474 UND SK-BR-3**42**

3.3.1. Western-Blot-Untersuchungen zum Vergleich des relativen PTEN-Gehalts von BT474 und SK-BR-3

43

3.3.2. Immunhistochemische Darstellung des PTEN-Proteins

44

3.4 SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOSPHORYLIERUNG DES PTEN-PROTEINS**45**

3.4.1. Die PTEN-Phosphorylierung am Ser380, Thr382 und Thr283 nach Stimulation mit dem Antikörper Trastuzumab bei BT474

46

3.4.2. Die PTEN-Phosphorylierung am Ser380, Thr382 und Thr283 nach Stimulation mit dem Antikörper Pertuzumab bei BT474

47

3.4.3. Die PTEN-Phosphorylierung am Ser380, Thr382 und Thr283 nach Stimulation mit dem Antikörper Trastuzumab bei SK-BR-3

48

3.4.4. Die PTEN-Phosphorylierung am Ser380, Thr382 und Thr283 nach Stimulation mit dem Antikörper Pertuzumab bei BT474

49

4 DISKUSSION**50****4.1. DIE PHOSPHORYLIERUNG DES ERBB2-REZEPTORS NACH BEHANDLUNG VON BT474 UND SK-BR-3 MIT TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB****50**

Die spezifische Phosphorylierung des ErbB2-Rezeptors am Tyrosin 877 nach Behandlung mit Trastuzumab und Pertuzumab

51

4.1.2. Die biologische Funktion des Tyrosin 877 des erbB-2-Rezeptors

52

4.1.3. Die spezifische Phosphorylierung des ErbB2-Rezeptors am Tyrosin 1248 nach Behandlung mit Trastuzumab und Pertuzumab

53

4.1.4. Die biologische Funktion des Tyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors und die Wirkungsweise der CSK Homologous Kinase (CHK)

53

4.1.5. Zusammenfassende Betrachtung des Wirkungsmechanismus der beiden Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab auf die Phosphorylierungsstellen des erbB2-Rezeptors

54

4.2. DER ANTIPROLIFERATIVE EFFEKT VON TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB AUF DIE MAMMAKARZINOMZELLINIEN BT474 UND SK-BR-3**55**

4.2.1. Der antiproliferative Effekt von Trastuzumab und Pertuzumab auf BT474

56

4.2.2. Der antiproliferative Effekt von Trastuzumab und Pertuzumab auf SK-BR-3

56

4.2.3. Zusammenfassende Betrachtung des antiproliferativen Effekts der Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab auf die Mammakarzinomzelllinien BT474 und SK-BR-3

57

4.3. DER UNTERSCHIEDLICHE PTEN-GEHALT DER BEIDEN ZELLINIEN BT474 UND SK-BR-3**57**

4.3.1. Die Regulation der Transkription des PTEN-Gens

58

4.4. DIE PHOSPHORYLIERUNG DES PTEN-PROTEINS**59**

4.4.1. Die Untersuchungen an den Phosphorylierungsstellen Ser380, Thr 382 und Thr 383

59

4.4.2. Die biologische Funktion der Phosphorylierungsstellen Ser380, Thr 382 und Thr 383

61

4.4.3. Die Phosphorylierung des PTEN als Modifikation der Bindungsaffinität des PTEN für Moleküle an der Zellmembran

62

4.4.4. Rekrutierung der PTEN-Moleküle an die Zellmembran als fundamentaler Mechanismus zur Inhibition des Phosphatidylinositol-3-Weges

62

4.4.5. Die Bedeutung des im Zellkern lokalisierten PTEN-Proteins

63

5. ZUSAMMENFASSUNG**65****6. AUSBLICK****67****7. LITERATURVERZEICHNIS****69****8. ERKLÄRUNG ZUR EINGENSTÄNDIGEN ANFERTIGUNG****75****9. LEBENSLAUF****76****10. DANKSAGUNG****78**

1. EINLEITUNG

In den letzten zehn Jahren haben sich mehrere neuartige Behandlungsformen in der modernen Onkologie etabliert. Im Gegensatz zu den klassischen Zytostatika, die ihre Wirkung auf alle sich teilenden Zellen entfalten, versuchte man tumorzellspezifische, molekulare Marker (z. B. Rezeptoren) zu identifizieren, um wirkungsspezifischere Medikamente zu entwickeln. Ein Ergebnis waren Antikörper, die gegen Rezeptoren auf der Tumorzelloberfläche gerichtet sind und Medikamente, die selektiv den Wachstumsfaktorrezeptoren nachgeschaltete Signalwege blockieren, wie z.B. die Tyrosinkinasehemmer.

Ein Beispiel für diese Antikörpertherapie stellt der gegen den Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 gerichtete Antikörper Trastuzumab (Handelsname: Herceptin) dar, der zuerst zur Behandlung des metastasierten Stadiums des Mammakarzinoms zugelassen war und aktuell auch adjuvant ergänzend zur Strahlentherapie und Zytostatikabehandlung angewendet wird. Zwar ist dieser therapeutische Antikörper nicht nur gegen den ErbB2-Rezeptor der Tumorzellen, sondern auch gegen denselben Rezeptor auf nicht-transformierten Zellen gerichtet, jedoch ist die Therapie deutlich verträglicher als die konventionelle Zytostase, da weniger andere Gewebe geschädigt werden. Wichtig ist die Tatsache, dass der Antikörper nur bei Erb2-überexprimierenden Tumoren eingesetzt werden kann, was bedeutet, dass die Tumoren hinsichtlich ihrer erbB2-Rezeptordichte untersucht werden müssen. Somit kann nach histologischer Untersuchung vorausgesagt werden, ob die Therapie einen Nutzen für den Patienten erbringt oder nicht.

Die Forschung in der modernen Onkologie bewegt sich in Richtung tumorspezifischer Medikamente, die erst nach forcierter Grundlagenforschung an Tumorzellen entwickelt werden können. Tumorspezifischere Medikamente können additiv zur klassischen Zytostase deren Wirkung verstärken und auch relativ nebenwirkungsarm in der Monotherapie angewendet werden, was die Lebensqualität des Patienten deutlich erhöht. Durch die Aufdeckung entsprechender biochemischer Reaktionspfade innerhalb der Tumorzelle können weitere Marker gefunden werden, die vor dem Einsatz der *target*-spezifischen Medikamente deren voraussichtliche Wirksamkeit anzeigen. Somit bewegen sich die modernen onkologischen Therapieformen zu einer prädikativen, für den Patienten individuell gestaltete Therapie.

1.1. DAS MAMMAKARZINOM

1.1.1. EPIDEMIOLOGIE

In der westlichen Welt erkrankt jede achte bis zehnte Frau in ihrem Leben an einem Mammakarzinom, welches zugleich die häufigste maligne Erkrankung der Frau darstellt. Die Inzidenz liegt somit bei jährlich 110 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen. In der Altersgruppe der 35- bis 55-jährigen Frauen stellt das Mammakarzinom die häufigste Todesursache dar. Mit steigendem Alter nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, an einem Mammakarzinom zu erkranken. In den letzten Jahren ist die Morbiditätsrate angestiegen, derzeit beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 75 %, die 10-Jahres-Überlebensrate ca. 60 % [1].

1.1.2. LOKALISATION

Ca. 55 % der malignen Mammatumore befinden sich im äußeren oberen Quadranten, 15 % im inneren oberen Quadranten, 5 % im inneren unteren Quadranten und 10 % im äußeren unteren Quadranten. 15 % der Tumoren entstehen im Bereich der Mamille [1].

1.1.3. ÄTIOLOGIE

In vielen Punkten ist die Ätiologie des Mammakarzinoms bis heute unbekannt. Es sprechen allerdings eine Reihe von Indizien dafür, dass bei der Tumorgenese hereditäre, hormonelle und Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms gehen einher: eine positive Familienanamnese, frühe Menarche / späte Menopause, Nulliparae und spätes Erstgebären, hormonelle Imbalancen (z.B. erhöhter Östrogenspiegel), Adipositas, zunehmendes Alter, ein Karzinom der kontralateralen Brust, duktale Hyperplasie, das Lobuläre und das Duktale Carcinoma *in-situ* (CIS) [2].

1.1.4. HISTOPATHOLOGISCHE KLASSIFIKATION

Bei den Mammakarzinomen kann man eine Vorläuferläsion zu den invasiven Karzinomen beschreiben, das CIS. Es ist durch eine neoplastische Proliferation von malignen epithelialen Zellen innerhalb der duktal-lobulären Drüsenschläuche charakterisiert. Vom gefäßführenden Binde- und Fettgewebe ist es durch eine intakte Basalmembran abgegrenzt.

Je nachdem, ob es innerhalb des Läppchens oder innerhalb des Ganges der Brustdrüse auftritt, spricht man von einem Lobulären Carcinoma in situ (LCIS) oder einem Duktalen Carcinoma in situ (DCIS).

Die invasiven Mammakarzinome stellen infiltrativ wachsende, maligne epitheliale Tumoren dar, welche ihren Ausgang von den *In-situ*-Karzinomen nehmen. Ähnlich wie bei den *In-situ*-Karzinomen zählen zu den häufigsten Typen das invasive lobuläre Karzinom, welches in ca. 10 – 20 % der Fälle gefunden wird und durch einen lockeren Tumorzellverband charakterisiert ist. Das invasive duktale Karzinom bestreitet mit ca. 70 % den Hauptanteil der Mammakarzinome. Als seltene Subtypen des invasiv duktales Karzinoms können das medulläre Karzinom (< 1 %), das Gallertkarzinom (2 %), das tubuläre Karzinom (1 – 2 %), das papilläre Karzinom (< 1 %) und das inflammatorische Mammakarzinom angesehen werden. Ca. 70 % der Invasiv duktales Karzinome gehören dem Typ „not otherwise specified“ (NOS) an [2].

1.1.5. TUMORKLASSIFIKATION

Die WHO (World Health Organisation) und die UICC (Union Internationale Contre le Cancer) haben Richtlinien zur Klassifikation von Tumoren aufgestellt. Es folgt die aktuell gültige Klassifikation des Mammakarzinoms in tabellarischer Form [3].

Malignitätsgrad (Grading)

Berücksichtigt werden Drüsenbildung, Kernatypien und Anzahl der Mitosen in 10 großemäßig definierten Gesichtsfeldern.

G 1 = hoch differenziert

G 2 = mäßig differenziert

G 3 = schlecht / nicht differenziert

Ausbreitung (Staging)

Primärtumorstatus:

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Malignität
pTis	Carcinoma in situ: intraduktales Karzinom oder lobuläres Carcinoma in situ oder Morbus Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor Anmerkung: Der Morbus Paget, kombiniert mit einem nachweisbaren Tumor, wird entsprechend der Größe des Tumors klassifiziert.
pT1mic	Carcinoma in situ mit einem minimal invasiven Anteil von $\leq 0,1$ cm
pT1	Tumor max. Durchmesser $\leq 2,0$ cm
pT1a	max. Durchmesser $> 0,1$ cm bis 0,5 cm
pT1b	max. Durchmesser $> 0,5$ cm bis 1 cm
pT1c	max. Durchmesser > 1 cm bis 2 cm
pT2	Tumor max. Durchmesser $> 2,0$ cm bis 5 cm
pT3	Tumor max. Durchmesser $> 5,0$ cm

pT4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut Anmerkung: Die Brustwand schießt Rippen, Interkostalmuskeln und den M. serratus anterior mit ein, nicht aber die Pektoralismuskulatur
pT4a	mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	mit Ödem, Ulzeration der Brustwand oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT4c	beide obigen Kriterien (pT4a und pT4b)
pT4d	inflammatorisches Karzinom [3]

Regionärer Lymphknotenstatus:

pN	Lymphknotenmetastasen
pNX	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
pN1mi	Mikrometastasen > 0,2 – 2 mm
pN1a	Metastasen in 1 – 3 axillären Lymphknoten
pN1b	Mammaria-interna-Lymphknoten bei Sentinelbiopsie, klinisch nicht evident
pN1c	Metastasen in 1 – 3 axillären Lymphknoten und Mammaria-interna-Lymphknoten bei Sentinelbiopsie, klinisch nicht evident
pN2a	Metastasen in 4 – 9 axillären Lymphknoten
pN2b	Metastasen in auch klinisch erkennbaren Mammaria-interna-Lymphknoten bei fehlenden axillären Metastasen
pN3a	Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten oder Metastasen in infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in klinisch evidenten Mammaria-interna-Lymphknoten bei positiven axillären Lymphknoten oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und Mammaria-interna-Lymphknoten bei Sentinelbiopsie oder klinisch evidente Metastasen
pN3c	Metastasen in supraklavikulären Lymphknoten [3]

Fernmetastasenstatus:

pM	Fernmetastasen
MX	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen [3]

DNA-Ploidie

Erfasst wird die Menge des DNA-Anteils, z. B. mittels der Durchflusszytometrie. Euploide Tumoren haben häufig eine günstigere, aneuploide Tumoren dagegen eine ungünstigere Prognose. Die Messung ist an Feinnadelpunktaten möglich [2]; die Ploidieanalytik wird jedoch nicht routinemäßig durchgeführt und zieht bis heute keine direkten, therapeutischen Konsequenzen nach sich.

Rezeptorstatus

Hormone wie Östrogen und Progesteron haben auf normale und Karzinomzellen eine wachstumsfördernde Wirkung. Deshalb wird heute mit immunhistochemischen Methoden

(Antikörper gegen Östrogen- und Progesteronrezeptoren) der Rezeptorstatus semiquantitativ bestimmt. Es ergeben sich damit Hinweise auf die Prognose und eine mögliche Hormontherapie (z.B. mit Tamoxifen).

Die beste Prognose haben Östrogen- und Progesteronrezeptor-positive Karzinome nach entsprechender Hormontherapie [2].

1.1.6. PATHOGENESE – MOLEKULARE KARZINOGENESE

Viele Details der molekularen Karzinogenese des Mammakarzinoms sind noch unbekannt, die Aufklärung der genetischen Grundlagen steht in vielen Bereichen noch am Anfang. Es kann jedoch wie bei anderen Karzinomen davon ausgegangen werden, dass das invasive Mammakarzinom über zahlreiche genetische Alterationen über die Stufe des Carcinoma *in-situ* entsteht.

Molekularbiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass bei den Karzinomzellen häufig Amplifikationen von Onkogenen und Deletionen bei Tumorsuppressorgenen vorliegen. Es hat sich herausgestellt, dass sich Mammakarzinome über genetisch definierte Wege entwickeln, die bestimmten morphologischen Typen der *in-situ*- und invasiven Karzinome zugeordnet werden können [2].

In ca. 25 – 30 % der Fälle konnte eine Amplifikation im 17q-Bereich nachgewiesen werden, welcher für das Produkt des *c-erbB2*-Gens kodiert. Es handelt sich hierbei um einen Wachstumsfaktor-Rezeptor aus der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, der über unterschiedliche Signaltransduktionswege das Wachstum und die Motilität von Zellen fördert. Bei diesen Karzinomen wird eine Überexpression des ErbB2-Rezeptors in der Zellmembran festgestellt [2].

1.2. DIE REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN DER ERBB-FAMILIE

1.2.1. DIE FAMILIE DER REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN

Der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist gemeinsam, dass sie eine einzige Transmembran-Helix besitzen, die das C-terminale Ende im Inneren der Zelle mit dem extrazellulären Anteil des Rezeptors verbindet [4].

Sämtliche bekannte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind Monomere, mit Ausnahme der Gruppe der Insulin-Rezeptoren. Bislang konnten 20 Subfamilien an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen identifiziert werden (vgl. Abb. 1).

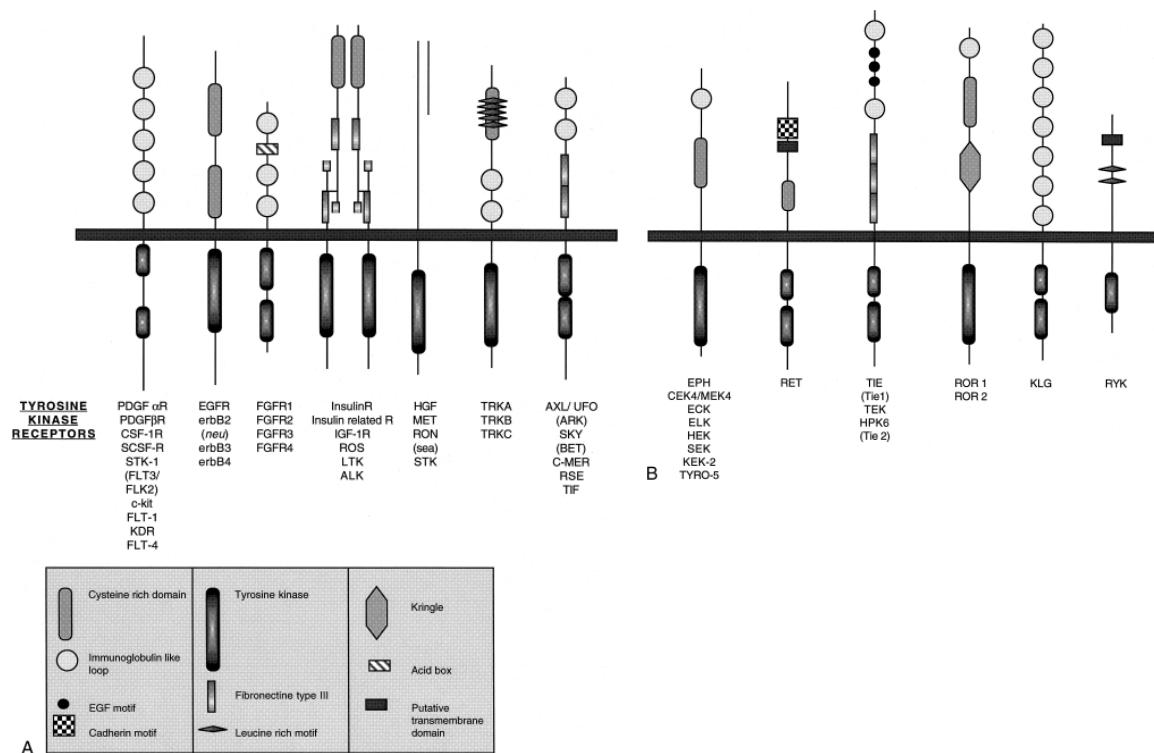


Abb. 1: Die Familien der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen [66]

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen leiten nach Bindung eines extrazellulären Liganden über eine komplexe Kaskade von Signalwegen einen Trigger ins Zellinnere weiter. Die Voraussetzung für das Anschalten der Signalwege ist, dass der intrazelluläre Tyrosinanteil des Rezeptors während der Aktivierung phosphoryliert wird [154] und an diese Phosphorylierungsstellen spezifisch intrazelluläre Signalmoleküle binden.

1.2.2. DIE SUBKLASSE DER ERBB-REZEPTOREN

Zur Familie der ErbB-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören der ErbB1, der auch als EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) oder HER1 bezeichnet wird, der ErbB2 (HER2/neu), der ErbB3 (HER3) und der ErbB4 (HER4). Drei der vier Rezeptoren, nicht aber ErbB2, können extrazelluläre Liganden mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität binden (vgl. Abb. 2).

An den EGFR binden spezifisch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), Amphiregulin (AR) und der *transforming growth factor-α* (TGFα). Die Liganden Betacellulin (BTC), *heparin-binding* EGF (HB-EGF) und Epregrulin (EPR) binden sowohl an den EGFR als auch an den ErbB4. Die Hereguline (HRG), die auch als Neureguline (NRG) bezeichnet werden, stellen eine weitere Gruppe der ErbB-Liganden dar. NRG1 und NRG2 binden an den ErbB3 und den ErbB4. NRG3 und NRG4 stellen spezifische Liganden des ErbB4-Rezeptors dar [4] (vgl. Abb. 2).

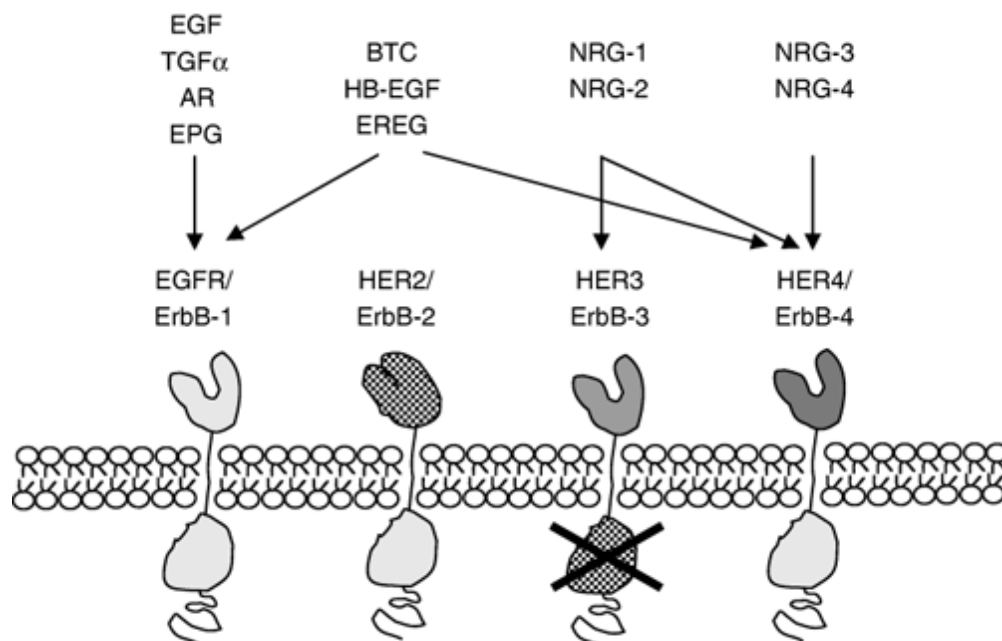


Abb. 2: Bestimmte Klassen von Wachstumsfaktoren können an die verschiedenen ErbB-Rezeptoren binden. EGF (*Epidermal Growth factor*), transforming growth factor α (TGF α) und Amphiregulin (AR) binden nur an den EGFR. HB-EGF (*heparin-binding EGF*), Epiregulin (ERE) und Betacellulin (BTC) können an alle Mitglieder der ErbB-Rezeptoren binden, außer dem ErbB2 und den ErbB3. Der ErbB2-Rezeptor besitzt keinen natürlichen Liganden. Die Neureguline NRG-1 und NRG-2 binden an ErbB3 und ErbB4, während die Neureguline NRG-3 und NRG-4 spezifisch an den ErbB4 binden. [67]

Fast alle ErbB-Liganden weisen ein spezifisches Expressionsprofil für verschiedene Organe und Entwicklungsstufen auf. Allerdings kann EGF in beinahe allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Die Liganden der ErbB-Familie wirken auf kurze Distanzen im Zellverband [6]. Durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne eines ErbB-Rezeptors wird mit der Homo- und Heterodimerisierung ein fundamentaler Mechanismus für die Signalvermittlung über die Zellmembran eingeleitet. Die Ligandenbindung induziert eine Konformationsänderung des ErbB-Rezeptors [7]. Dies hat zur Folge, dass ein Bereich in der extrazellulären Domäne, die so genannte Dimerisierungsschleife, exponiert wird, die die Interaktion der ErbB-Rezeptoren untereinander vermittelt.

Die Ausnahme bildet hier der ErbB2-Rezeptor, dessen Dimerisierungsschleife ohne Ligandenbindung konstitutiv exponiert ist. Diese Tatsache befähigt den ErbB2-Rezeptor unabhängig von einer Ligandenbindung mit einem anderen Rezeptor der ErbB-Familie zu dimerisieren, was als Heterodimerisierung bezeichnet wird. Der ErbB2 kann aber auch mit weiteren ErbB2-Monomeren dimerisieren (Homodimerisierung) (Abb. 2) [8]. Der ErbB2-Rezeptor steht damit den Rezeptoren der ErbB-Subklasse als Dimerisierungspartner stets zur Verfügung [9]. Die übrigen Mitglieder der ErbB-Rezeptorenfamilie (außer ErbB3) können ebenfalls homodimerisieren.

Nach der Dimerisierung der entsprechenden Rezeptoren werden in einer Konformationsänderung die intrazellulären Anteile der Tyrosinkinase in eine passende Orientierung gebracht, um die Phosphorylierung der regulatorischen Tyrosinreste zu ermöglichen. Heute geht man davon aus, dass die Phosphorylierung überwiegend gegenseitig, also *in-trans* erfolgt [10]. Danach ist der Zugang von ATP und Substrat zum aktiven Zentrum der Kinase freigegeben. Die Übertragung des γ -Phosphats aus dem ATP auf die Tyrosinreste kann erfolgen, was Bindungsstellen für die Proteine der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden bereitstellt [11;7].

1.2.3. DIE SIGNALTRANSDUKTION DER ERBB-REZEPTOREN

Nach erfolgter Ligandenbindung, Homo- bzw. Heterodimerisierung, sowie Phosphorylierung leiten die ErbB-Rezeptoren einen externen Stimulus über unterschiedliche Signaltransduktionswege ins Zellinnere weiter [12]. Damit wird eine spezifische zelluläre Antwort erreicht [13]. Die Heterogenität der Signalwege entsteht dadurch, dass jeder der vier Rezeptoren an seinem C-terminalen Ende einen unterschiedlichen Bereich aufweist, in dem sich Tyrosinreste mit unterschiedlicher Sequenzumgebung befinden. Diese ermöglichen nach deren Transphosphorylierung durch den ErbB-Dimerisierungspartner die Bindung von verschiedenen Rezeptor-spezifischen Adapter- und Signalproteinen [11].

Ein wichtiger Signalweg, der von allen ErbB-Rezeptoren eingeleitet werden kann, ist der Ras-MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)-Signalweg. Er gibt einen mitogenen Effekt ans Zellinnere weiter [4].

Ein weiterer, wichtiger Signalweg stellt der PI3K (*Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase*)-Signalweg dar, der einen anti-apoptotischen Effekt vermittelt. Hier gibt es bezüglich der Aktivierung durch die einzelnen ErbB-Rezeptoren Unterschiede. Der EGFR und der ErbB2-Rezeptor binden ausschließlich über Adapterproteine an die entsprechende Untereinheit p85 der PI3K, während ErbB3 und ErbB4 direkte Bindungsstellen für die p85-Untereinheit der PI3K aufweisen und somit ein extrazelluläres Signal effektiver an den PI3K-Weg weiterleiten können [4,10]. Weitere bekannte Signalwege, die von der Familie der ErbB-Rezeptoren aktiviert werden, stellen der Weg über die Phospholipase C γ (PLC γ) und die JAK/STAT (*Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription*)-Proteine dar [4,10]. Aufgrund der Diversität möglicher ErbB-getriggelter Signalwege und der komplexen Regulation ihrer Aktivität können die ErbB-Rezeptoren viele Zellfunktionen beeinflussen. Dazu gehören wichtige Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Adhäsion, Angiogenese, Apoptose und Differenzierung [14,4,10,8].

1.2.4. DIE ROLLE DER ERBB-REZEPTOREN IN DER TUMORGENESE DES MAMMAKARZINOMS

Man geht heute davon aus, dass verschiedene Mechanismen zum Tumorwachstum beitragen, wie die Überexpression von Liganden, eine dysregulierte ErbB-Expression, eine Rezeptor-Überexpression und schließlich Mutationen und Deletionen der Rezeptorgene, die zu einer konstitutiven Aktivierung führen [14,6,7].

Eine Überexpression des ErbB2 wurde in ca. 25% – 30% der Mammakarzinomfälle entdeckt, was dazu geführt hat, dass die ErbB-Rezeptor-Familie, insbesondere der ErbB2-Rezeptor und der EGFR, Gegenstand intensiver Forschung wurden [15].

Beim Mammakarzinom wird eine Überexpression des ErbB2 in 97% der Fälle durch eine Amplifikation des Rezeptorgenes hervorgerufen [16]. So kann eine Überexpression des ErbB2 eine Zelltransformation unabhängig von der Ligandenbindung bewirken [8]. Die mitogene Signalleitung wird hier im Wesentlichen durch die sehr hohe Rezeptordichte aufrechterhalten. Dabei spielt nicht nur die Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren der ErbB-Familie eine Rolle, sondern vor allem auch die Homodimerisierung der ErbB2-Rezeptormonomere untereinander [17]. Den stärksten proliferativen Reiz unter allen Rezeptorkombinationen scheint die Heterodimerisierung des ErbB2 mit dem katalytisch inaktiven ErbB3 zu vermitteln [18]. Klinisch imponieren diese Tumoren durch ein besonders aggressives Wachstum und eine frühzeitige lokale Lymphknotenmetastasierung. Auch eine hämatogene Metastasierung wird häufig sogar schon bei niedrigem Primärtumorstatus angetroffen. Fernmetastasen finden sich besonders häufig in den Knochen, der Leber und in den Lungen. Sie führen zu einer palliativen Therapiesituation. Die Patientinnen werden derzeit mit Zytostase, Hormontherapie, sowie mit monoklonalen Antikörpern gegen ErbB2 (Herceptin™) behandelt. Bei Vorliegen von Fernmetastasen beträgt die mittlere Überlebenszeit 18 Monate, die 5-Jahres-Überlebensrate 10% [19].

1.2.5. DIE MONOKLONALEN ANTIKÖRPER TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB IN DER THERAPIE DES MAMMAKARZINOMS

Da ein Zusammenhang zwischen einem kürzeren Überleben von Patientinnen mit einem Mammakarzinom [20] und einem besonders aggressiven biologischen Verhalten der Tumore mit Überexpression von ErbB2 [21] gefunden wurde, rückte dieser Rezeptor in den Fokus der Wissenschaft und der pharmazeutischen Industrie.

Die Unternehmen Genentech und Roche entwickelten den humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin™). Dieser Antikörper bindet an die Domäne IV des extrazellulären Teils des ErbB2, der aus insgesamt vier Domänen besteht (vgl. Abb. 3) [22]. Die Domänen I und III dienen den anderen Rezeptoren der ErbB-Familie als Ligandenbindungsstellen. Die Domäne II bildet mit dem Dimerisierungsloop, der die Wechselwirkung unter den ErbB-Rezeptoren vermittelt, die entscheidende Struktur für die Hetero- und Homodimerisierung. Wird eine Brustkrebszelllinie mit Trastuzumab behandelt, so kann man in der Mehrzahl der Fälle eine Downregulation des ErbB2 feststellen, sowie eine Inhibition des Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)- Signalwegs [23]. Ferner werden dem Antikörper antiangiogenetische Eigenschaften zugeschrieben [23].

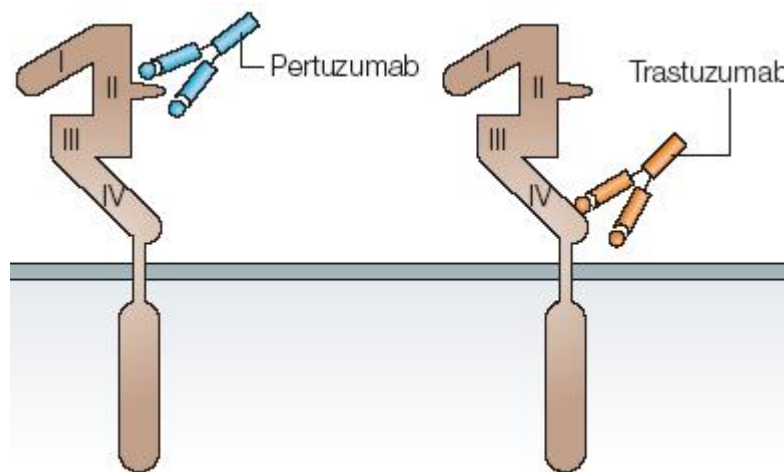


Abb. 3: Der Antikörper Pertuzumab bindet an die extrazelluläre Domäne II des c-erbB2, welche für die Hetero- und Homodimerisierung des ErbB2-Rezeptors verantwortlich ist. Der Antikörper Trastuzumab bindet dagegen an die Domäne IV. [entnommen aus 22]

1998 erhielt der Antikörper Trastuzumab die Zulassung für die Therapie des ErbB2-überexprimierenden metastasierten Mammakarzinoms. Vor der Antikörpertherapie muss der ErbB2-Rezeptorstatus genau analysiert werden. Als Goldstandard wird die (Floureszenz)-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) beschrieben [20,24], mit der man die Genamplifikation des *erbB2*-Gens nachweisen kann. Um diejenigen Patientinnen zu ermitteln, die für die Trastuzumab-Therapie in Frage kommen, wird in vielen Fällen die preisgünstigere Immunhistochemie angewendet. Trotz eines in der Immunhistochemie oder in der FISH-Analyse ermittelten maximalen ErbB2-Überexpressionslevels reagierten nur 18 – 41 % der Tumore auf die Trastuzumab-Monotherapie [23], bei der adjuvanten Gabe in Kombination mit Zytostatika ca. 50 % [25]. Außerdem kann sich auch nach anfänglicher Sensitivität gegenüber Trastuzumab unter dieser Therapie eine Resistenz entwickeln. Statistisch gesehen erweist sich aber ein Einbeziehen von Trastuzumab in das

Therapie-Konzept nicht nur beim metastasierten Mammakarzinom, sondern auch in der adjuvanten Therapie, als vorteilhaft.

Im Jahre 2005 wurden die Ergebnisse von vier klinischen Studien (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trial [30], North Central Cancer Treatment Group trial [30] und Herceptin Adjuvant [HERA] trial veröffentlicht. Ziel dieser Studien war es, den Einfluss einer Trastuzumab-Therapie bei primär operablen Tumoren mit einer ErbB2-Überexpression nach der Operation und während oder nach der Zytostatikatherapie (insbesondere in Kombination mit Paclitaxel) auf das ereignisfreie Überleben zu untersuchen. Diese Studien konnten einen ca. achtprozentigen Vorteil für das ereignisfreie Überleben von zwei Jahren bei der Trastuzumab-Therapie liefern (HERA-trial) [31]. Die B-31 und die N9831-Studie zeigten einen zwölfprozentigen Vorteil für das ereignisfreie Überleben in einem Zeitraum von drei Jahren während der adjuvanten Trastuzumab-Therapie [30]. Dadurch wurde der Stellenwert des Antikörpers Trastuzumab in der Therapie des Mammakarzinoms deutlich aufgewertet und der Antikörper bereits für die adjuvante Therapie zugelassen.

Mit dem Ziel, dass auch Patientinnen mit einer moderaten ErbB2-Expression von einer Antikörpertherapie profitieren sollen, entwickelte die Firma Genentech, San Francisco, den monoklonalen Antikörper Pertuzumab. Dieser kann an die extrazelluläre Domäne II binden und es gibt Hinweise dafür, dass er die Homodimerisierung des ErbB2 untereinander und die Heterodimerisierung des ErbB2 mit den anderen Rezeptoren der ErbB-Familie verhindert [22].

In der Literatur findet man Hinweise aus *in-vitro*-Experimenten, dass die Kombination von Pertuzumab mit Trastuzumab einen synergistischen Effekt besitzt [32]. Das *Cedars-Sinai Prostate Cancer Center and Medical Center* der Universität von Südkalifornien führte eine Phase-I-Studie mit dem Antikörper Pertuzumab an 21 Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren nach dem Progress der Erkrankung unter der Standardtherapie durch, wobei bei zwei Patienten eine Regression eintrat. Die Pharmakokinetik entsprach annähernd der von Trastuzumab bei vergleichbar guter Verträglichkeit. Derzeit laufen mit dem Antikörper einige Phase-II-Studien an verschiedenen Tumorentitäten [33].

Insgesamt gesehen sind die Erfolge der Trastuzumab-Therapie noch insuffizient und man muss feststellen, dass der Her2-Gen- bzw. Rezeptornachweis ein wertvolles, zusatzdiagnostisches Verfahren mit prognostischer Relevanz darstellt, dass sich daraus aber keine Vorhersagen bzgl. des Ansprechens auf *target*-spezifische Therapien wie z. B. mit Herceptin machen lassen. Der Her2 Nachweis hat damit keinen prädiktiven Wert und in vielen Fällen ist von vornherein eine Trastuzumab-Resistenz zu beobachten, oder sie entwickelt sich während der Therapie. Dies zeigt, dass noch weitere Faktoren zusätzlich zur Überexpression von ErbB2 für die Sensitivität

gegenüber Trastuzumab verantwortlich sind. Daher sucht man intensiv nach Biomarkern bzw. molekularen Mechanismen, die für ein Ansprechen oder die Resistenz (trotz Her2 Überexpression) verantwortlich sind, um einen Her2 basierten, therapeutischen Eingriff bei Mammakarzinompatientinnen effizienter gestalten zu können. Die molekularen / zellulären Ursachen für eine Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Target-spezifischen Therapien sind sicher multifaktoriell und individuell unterschiedlich. Mögliche Ursachen für ein Fehlen des Ansprechens auf eine Therapie werden unter anderem in der fehlenden Expression von PTEN (vgl. 1.3.) und der Koexpression der weiteren ErbB-Rezeptoren gesehen [26,27,28,29].

1.3. DIE ROLLE DES PTEN-PROTEINS AUF DAS ANSPRECHEN DER THERAPIE DES MAMMAKARZINOMS MIT TRASTUZUMAB (HERCEPTIN™)

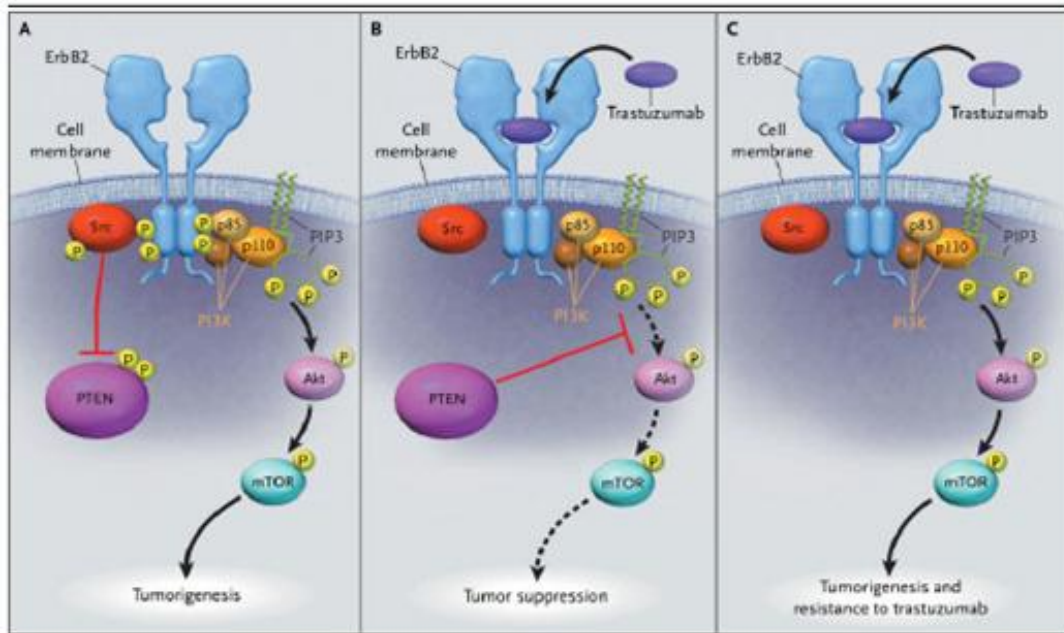
Untersuchungen haben zeigen können, dass die Therapieresistenz mit einer Mutation des PTEN-Tumorsuppressorgens und dem nachfolgenden Verlust der PTEN-Expression in der Zelle einhergehen kann [28].

Das PTEN-Protein besteht aus einer N-terminalen Phosphatase-Domäne, einer Lipid-bindenden C2-Domäne und einer C-terminalen Domäne, die aus 50 Aminosäuren aufgebaut ist und als „Schwanz“ bezeichnet wird. Auf dem Schwanz befinden sich zahlreiche Phosphorylierungsstellen. Die Regulation der Stabilität und Aktivität des Proteins wird mit der Phosphorylierung der auf dem Schwanz befindlichen Aminosäuren Ser380, Thr282 und Thr383 in Verbindung gebracht. Man geht davon aus, dass das PTEN-Protein im phosphorylierten Zustand inaktiv ist und somit keine Tumorsuppressorwirkung besitzt. Im umgekehrten Falle, der Dephosphorylierung, ist das Protein aktiv und wirkt als Tumorsuppressor [34].

Die wachstumshemmende Wirkung des aktiven PTEN-Proteins ist auf die Fähigkeit zurückzuführen, die *second-messenger-Moleküle* Phosphatidyl-inositol-2,4,5-triphosphat und Phosphatidyl-inositol-3,4-bisphosphat zu dephosphorylieren. Auf diese Weise kann der PI3K-Akt-Signalweg wirkungsvoll inhibiert werden (vgl. Abb. 4) [35].

Nagata et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Trastuzumab an den ErbB2-Rezeptor das Tumorsuppressorprotein PTEN stabilisiert und aktiviert, wodurch eine konsequente Inhibition des PI3K-Akt-Signalweg, der einen anti-apoptotischen Reiz weiterleitet, resultiert [28]. Aus diesen Umständen kann man annehmen, dass das PTEN-Protein während der Therapie des Mammakarzinoms mit Trastuzumab eine wichtige Schlüsselfunktion besitzen könnte. Man geht davon aus, dass z.B. bei einer Mutation des *PTEN*-Gens, welche mit einem Aktivitätsverlust des

PTEN-Proteins einhergeht, eine Therapieresistenz gegenüber Trastuzumab auftritt, da die Signal-
leitung über den PI3K-Akt-Signalweg ungehindert ablaufen kann (vgl. Abb. 4.).



- Abb. 4: A) Die Überexpression des ErbB2 führt nach dessen Homodimerisierung zur Autophosphorylierung (P), was die Bindung der Src-Kinase und der p85-Untereinheit der Phosphatidyl-inositol-3-Kinase ermöglicht.
Die Bindung der PI3K führt zur Stimulierung eines Signalweges, der aus Akt und dem mammalian target of rapamycin (mTOR) besteht und das Wachstum von Tumorzellen stimuliert. Die aktivierte Src-Kinase kann das C-terminale Ende des PTEN phosphorylieren und es somit inaktivieren, was den PI3K-Weg aktiviert und die Entstehung höherer Konzentrationen von Phosphatidyl-inositol-3-phosphat fördert.
- B) Wenn Trastuzumab an den ErbB2 bindet, wird auf noch unbekannte Art und Weise die Dissoziation des Src-Proteins und dessen Inaktivierung bewirkt. PTEN kann deshalb nicht phosphoryliert und somit nicht inaktiviert werden, es bewirkt die Inhibition des PI3K-Akt-Weges.
- C) Nagata et al. konnten zeigen, dass bei einem partiellen oder totalen Verlust des PTEN-Proteins nach Bindung von Trastuzumab an den ErbB2, die PI3K nicht inhibiert wird, um den PI3K-Akt-Weg zu blockieren. Damit könnte ein Element der Therapieresistenz von einigen Tumoren gegenüber Trastuzumab erklärt werden [entnommen aus 28].

1.4. NEUE THERAPIEANSÄTZE ZUR INHIBITION DER SIGNALWEGE DER ERBB-REZEPTOREN

Aufgrund intensiver Forschungstätigkeit konnten immer mehr therapeutisch wirksame Substanzen, die unterschiedliche Angriffspunkte in der Tumorzelle besitzen, entwickelt werden: zum Einen die spezifischen monoklonalen Antikörper, wie Trastuzumab (Herceptin™, Ziel: ErbB2) und Cetuximab (Erbix™; Ziel: EGFR), die spezifisch an die extrazelluläre Domäne des Antigens binden, und zum anderen zahlreiche Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), die einen oder mehrere Mitglieder der ErbB-Familie durch Blockierung des aktiven Zentrums der Tyrosinkinase inhibieren. Ein bekanntes Beispiel hierfür stellt Erlotinib (Tarceva™) dar, das gegen den

EGFR gerichtet ist. Es ist bereits für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des Pankreaskarzinoms zugelassen. Zusätzliche alternative Therapieansätze beinhalten den Einsatz von siRNA und Antisense-Oligonukleotiden. Weitere Beispiele stellen trifunktionale Antikörper, wie z. B. Ertumaxumab, Immunoliposomen, gekoppelte Antikörper zum gezielten Transport von Toxinen oder anderen Wirkstoffen dar [36,37,38].

Derzeit befinden sich viele „*target*-spezifische“ Medikamente und deren Kombinationen in klinischer Erprobung, eine Übersicht soll Tabelle 1 vermitteln:

Medikament	Typ	Ziel	Hersteller	aktueller Status
Trastuzumab (Herceptin)	humanisierter mAb	ErbB2	Genentech/Roche	Zul.: c-erbB2-überexprimierendes, metastasiertes Mammakarzinom, seit Oktober 2006 adjuvant, auch nicht-metastasiertes Mammakarzinom
Pertuzumab	humanisierter mAb	ErbB2	Genentech	Phase II beim Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom und nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
Cetuximab (Erbix)	chimärer mAb	EGFR	ImClone/Merck KGaA, Bristol-Myers Squibb	Zul.: kolorektales Karzinom, HNO-Tumoren Studien: in Kombination mit and. Med. beim Pankreaskarzinom, nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom
Matuzumab	humanisierter mAb	EGFR	Merck KGaA	Phase II beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom, gynäkologische Tumoren, Pankreaskarzinom und Oesophaguskarzinom
Panitumumab (Vectibix)	humanisierter mAb	EGFR	Abgenix	Zulassung: kolorektales Karzinom, Studien: Nierenzellkarzinom, nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
Catumaxomab	trifunktionaler mAb	EpCAM, CD3, akzessorische Zellen	Fresenius/TRION-Pharma	Studien: Phase III beim malignen Aszites, Phase II beim Ovarialkarzinom, Phase II beim Magenkarzinom
Ertumaxomab (Rexomun)	Trifunktionaler mAb	ErbB2, CD3, akzessorische Zellen	Fresenius/TRION-Pharma	Studien: Phase II beim metastasierten Mammakarzinom
Gefitinib (Iressa)	TKI	EGFR	AstraZeneca	Zul.: Bronchialkarzinom (nichtkleinzellig) Studien: HNO-Tumoren, gastrointestinale Tumoren und Mammakarzinom
Lapatinib (Tykerb)	TKI	EGFR/ErbB2	GlaxoSmithKline	Zulassung beim therapieresistenten Mammakarzinom
Erlotinib (Tarceva)	TKI	EGFR	Genentech/OSI Pharmaceuticals	Zul.: nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom, Pankreaskarzinom Studien an vielen anderen Krebsarten
AEE788	TKI	EGFR/ErbB2/VEGFR	Novartis	Phase I, erster Multirezeptoreninhibitor, vermutlich viele Indikationen
CI-1033	irreversible TKI	EGFR/ErbB2	Pfizer	Phase II beim Mammakarzinom und Bronchialkarzinom (nicht kleinzellig)
Exel 7647 / Exel 0999	TKI	EGFR/ErbB2/VEGFR	Exelixis	kein Studie.
EKB-569	irreversible TKI	EGFR/ErbB2	Wyeth-Ayerst	Phase II beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom

Tab. 1: Auswahl neuer, in der Krebstherapie und in klinischer Erprobung befindlicher Medikamente TKI: Tyrosinkinase-Inhibitor; mAb: monoclonal Antibody [22] (modifiziert).

1.5. ZIELSETZUNG

Für die Tumorgenese des Mammakarzinoms spielen viele Faktoren eine Rolle. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der ErbB-Familie, insbesondere der EGFR und der ErbB2, rückten in den Fokus der Wissenschaft und der Pharmaindustrie. Es wurden schon einige Medikamente entwickelt, von denen viele noch in der Phase der klinischen Erprobung stehen, aber auch einige, wie im Falle des Trastuzumab (HerceptinTM), die bei der Therapie des Mammakarzinoms zum Einsatz kommen. Eine Reihe von Studien zeigten jedoch, dass das maligne Wachstum und die therapeutischen Erfolge auf der Basis der Überexpression des ErbB2-Rezeptors beim Mammakarzinom nicht sicher vorhergesagt werden können. Hierbei werden verschiedene Parameter, welche die Antwort auf eine Antikörpertherapie beeinflussen, diskutiert: die Koexpression anderer ErbB-Rezeptoren oder Defekte in der nachfolgenden Signaltransduktionskette, wie z.B. des PTEN-Proteins. Dabei ist in vielen Punkten noch unklar, was auf intrazellulärer Ebene geschieht, wenn ein therapeutischer Antikörper wie Trastuzumab (HerceptinTM) oder Pertuzumab zum Einsatz kommt.

Das Ziel dieser Arbeit ist ein Vergleich der Effekte der beiden Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab auf die Her2-Rezeptorphosphorylierung und die nachfolgenden Regulation der Aktivierung des PTEN-Proteins. Hierzu werden drei Untersuchungsblöcke bei zwei Mammakarzinomzelllinien mit Her2-Überexpression (BT474 und SK-BR-3) durchgeführt, zu denen es innerhalb der Arbeitsgruppe zahlreiche, Vordaten gibt:

- 1) Bei zwei ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinomzelllinien werden jeweils zwei für die Signaltransduktion wichtige Phosphorylierungsstellen des ErbB2-Rezeptors (pY877 und pY1248) auf ihren Phosphorylierungsgrad mittels Western-Blot vor und nach der Behandlung mit Pertuzumab untersucht. Für den Antikörper Trastuzumab lagen aus einer vorhergehenden Arbeit bereits Daten dazu vor [38]. Beide Datenblöcke sollen jeweils miteinander verglichen werden, um herauszufinden, ob es bei den beiden Antikörpern ein unterschiedliches ErbB2-Aktivierungsmuster gibt.
- 2) Mittels durchflusszytometrischer Analysen (statische DNA-Messung mit Bestimmung der S-Phase-Fraktion) soll herausgestellt werden, wie die beiden Antikörper Einfluss auf das Wachstum der beiden Tumorzelllinien nehmen.
- 3) Des Weiteren soll die Phosphorylierung des PTEN-Proteins vor und nach der Antikörperbehandlung mittels Western-Blot dargestellt werden, um zu untersuchen, inwieweit die Antikörperbehandlung einen Einfluss auf die Aktivität und Regulation des wichtigen

Tumorsuppressorproteins besitzt. Beide Zelllinien sollen dabei auch mittels proteinchemischer und immunhistochemischer Methoden auf ihren PTEN-Gehalt untersucht werden.

Die Untersuchungen sollen dazu dienen, weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen bei Mammakarzinomzellen, die bei einem Ansprechen auf Antikörpertherapien beteiligt sind, zu gewinnen. Das erweiterte Verständnis kann dazu beitragen, prädiktiv relevante Marker (und/oder Mechanismen) zu identifizieren um darauf aufbauend, langfristig *target*-spezifische Therapien spezifizieren zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. ZELLKULTUR

2.1.1. BENUTZTE ZELLINIEN

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden zwei Mammakarzinomzelllinien ausgewählt: BT474 und SK-BR-3. Beide Zelllinien weisen einen nahezu gleichen Level an Überexpression des ErbB2-Rezeptors auf, zeigen jedoch eine unterschiedlich starke EGFR-Koexpressionen [68]. Die Tumorzelllinie BT474 ist eine hypertetraploide Zelllinie, die aus einem invasiven duktalem Karzinom einer 60-jährigen Patientin isoliert wurde [40]. Histopathologisch wurde sie mit einem Differenzierungsgrad von G2 bis G3 beschrieben. BT474 besitzt ein amplifiziertes *erbB2*-Gen, was zur Überexpression des ErbB2-Rezeptors führt [41]. Ferner wurden Östrogen- und Progesteronrezeptoren nachgewiesen [42,64,44]. Die Tumorzelllinie SK-BR-3 wurde aus einem metastasierten Mammakarzinom (Adenokarzinom) einer 43-jährigen Patientin isoliert [40]. Histologisch handelt es sich um eine hypertri- bis hypotetraploide Zelllinie mit einem Differenzierungsgrad von G2 bis G3. Wie BT474 zeigt SK-BR-3 eine Überexpression des ErbB2-Rezeptors [41]. .

2.1.2. DIE STANDARDKULTUR

Sämtliche Zelllinien wurden als adhärent wachsende Monolayer entweder in Gewebekulturflaschen oder in 6-Well-Platten kultiviert und in Brutschränke gegeben. Die Temperatur lag bei 37 °C, der Kohlenstoffdioxidgehalt bei 5 %, der Sauerstoffgehalt bei 20 % bei gesättigter Luftfeuchtigkeit. Inkubiert wurden die Mammakarzinomzelllinien in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 5 % fötalem Kälberserum (FKS) und 0,2 % Phenolrot. Die Medien wurden in zweitägigem Abstand gewechselt.

Die Ernte von Zellen und die Bestimmung der Zellzahl

Sämtliche zellbiologische Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank (LaminAir Flow). Zum Ernten wurden die Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen. Danach erfolgte die Ablösung der adhärenenten Zellen mittels 0,25 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS vom Boden der Kulturflasche. Diese enzymatische Reaktion wurde mit einem doppelten Volumen an FKS-haltigem Medium gestoppt, die Suspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen

wieder in Medium resuspendiert und, falls eine bestimmte Anzahl von Zellen wieder ausgesät werden sollte, die Zellzahl mit dem Zellzählgerät Casy1 Model TCC der Firma Schärfe bestimmt.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum langfristigen Einfrieren von Zellen wurden diese nach der Ernte bei 1200 rpm für 5 min pelletiert und in kaltem Einfriermedium (DMEM mit 10 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid, DMSO) resuspendiert. Nach Überführen der Zellen in ein Kryoröhrchen, konnte man die geernteten Zellen mit Hilfe des Einfriergerätes NICOOL LM 10 langsam bis auf -100 °C abkühlen und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff lagern.

Um die gefrorenen Zellen wieder in Kultur zu überführen, wurden die Kryoröhrchen rasch im 37 °C Wasserbad aufgetaut und die Zellen mit Medium gewaschen. Die Aussaat erfolgte in T25-Kulturgefäßen. Nach einem Mediumwechsel am nächsten Tag konnte die Zellkultur wie oben beschrieben fortgeführt werden.

2.1.3. STIMULATION MIT WACHSTUMSFAKTOREN, MIT TRASTUZUMB UND PERTUZUMAB

Für die experimentellen Untersuchungen wurden je sechs unterschiedlich behandelte Zellkulturansätze vorbereitet, die unterschiedlichen Stimuli ausgesetzt waren. Um vergleichende Untersuchungen durchführen zu können, wurden die Antikörper Trastuzumab (Herceptin™) und Pertuzumab jeweils alleine oder in Kombination mit den ErbB-Liganden / Wachstumsfaktoren EGF und HRG zugesetzt, so dass sich zwei Ansätze ergaben. Die folgenden Tabellen sollen darüber Aufschluss geben:

Ansatz 1	EGFR-spezifischer Wachstumsfaktor	c-erbB3 und c-erbB4-Rezeptor spezifischer Wachstumsfaktor	anti-c-erbB2 Antikörper
A (Kontrolle)	---	---	---
B	EGF	---	---
C	EGF	---	Pertuzumab
D	---	HRG	---
E	---	HRG	Pertuzumab
F	---	---	Pertuzumab

Tab 2a: Darstellung der einzelnen Zusammensetzungen der Versuchsansätze mit dem Antikörper Pertuzumab

Ansatz 2	EGFR-spezifischer Wachstumsfaktor	c-erbB3 und c-erbB4-Rezeptor spezifischer Wachstumsfaktor	anti-c-erbB2 Antikörper
A (Kontrolle)	---	---	---
B	EGF	---	---
C	EGF	---	Trastuzumab
D	---	HRG	---
E	---	HRG	Trastuzumab
F	---	---	Trastuzumab

Tab 2b: Darstellung der einzelnen Zusammensetzungen der Versuchsansätze mit dem Antikörper Trastuzumab

Während der Langzeitinkubationen kamen Trastuzumab bzw. Pertuzumab in einer Konzentration von 10 µg/ml (65 nM) zum Einsatz. Die Wachstumsfaktoren wurden in einer Konzentration von 5 nM verwendet (EGF 30 ng/ml; HRG 40 ng/ml). Bei jedem Mediumwechsel wurden die Reagentien wieder zugesetzt. Für kurze Stimulationen kamen EGF (5 min) und HRG (10 min) in jeweils einer Konzentration von je 15 nM zur Verwendung. Bei der kombinierten Inkubation von EGF bzw. HRG mit einem therapeutischen Antikörper erfolgte vor der Zugabe der Wachstumsfaktoren die Inkubation mit Trastuzumab über 40 min bei EGF und über 35 min bei HRG. Bei einer ausschließlichen Behandlung mit Trastuzumab oder Pertuzumab wurden die Zellen über 45 min mit dem monoklonalen Antikörper versehen. Sämtliche Ansätze wurden gemeinsam geerntet und sofort auf Eis gestellt.

2.2. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.1. HERSTELLUNG VON DENATURIERTEN ZELLEXTRAKTEN (LYSATE)

Es wurden 1 Mio Zellen in T175-Kulturflaschen ausgesät und nach einer Wachstumsphase von sieben Tagen geerntet. Die gewonnenen Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 300 µl Lysispuffer versetzt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat in ein 15 ml Röhrchen gegeben und zur Fragmentierung der genomischen DNA 10 sec. mit Ultraschall behandelt. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und über 5 min lang bei 12000 rpm bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet verworfen und im Überstand die Proteinkonzentration bestimmt. Nach dem Aufteilen des Lysats in kleine Aliquots wurden diese bei einer Temperatur von – 80 °C gelagert.

2.2.2. DIE BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION MIT DEM BCA-PROTEIN-ASSAY-KIT

Die chemische Reaktion, die hinter dem Prinzip des BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce steht, ist die Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} durch die Proteine im alkalischen Medium zu Cu^+ reduziert wird. Zur Analyse wurden 10 μl der in TE-Puffer 1:10 verdünnten Proteinlysate und eine Proteinstandardlösung (25 – 2000 $\mu\text{g/ml}$ BSA in TE-Puffer), sowie eine Negativkontrolle, bestehend aus 10 μl TE-Puffer, auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht. Anschließend musste aus dem BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce die Lösung A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) mit der Lösung B (Kupfersulfat 4 %) im Verhältnis 1:50 gemischt und 200 μl des Gemisches zu jedem Well gegeben werden. Es folgte anschließend ein kurzes Vermischen. Nach 30 min bei 37 °C wurde mit dem ELISA-Reader bei 540 nm die Absorption gegen die Referenz gemessen. Mittels der Standard-Eichgerade konnte die Proteinkonzentration in den zu analysierenden Lysatproben berechnet werden.

2.2.3. DIE IMMUNPRÄZIPITATION

Um in den Western-Blots für die Untersuchung des PTEN-Proteins die Spezifität der Nachweisreaktion garantieren zu können, wurde den entsprechenden Ansätzen eine Immunpräzipitation vorgeschaltet.

Für die Immunpräzipitation wurde ein Zeitraum von zwei Tagen benötigt. Am ersten Tag wurden die Lysate auf Eis aufgetaut, 500 μg davon in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und je 0,5 μg des anti-PTEN-Antikörpers der Firma Cell Signaling hinzugefügt. Damit der Antikörper mit dem PTEN-Protein einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden kann, wurden die Proben bei 4 °C über Nacht auf einem sich drehenden Rad inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben mit 50 μl G-Sepherose versetzt und für weitere drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Um die überflüssigen, nicht gebundenen Antigene zu entfernen, wurden die Proben vier Mal mit einem Lysispuffer gewaschen und dabei stets auf Eis gehalten. Dazu wurden die Eppendorf-Cups in einer Kühlzentrifuge über 4 min lang bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand über dem so entstandenen Pellet wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 400 μl Lysispuffer resuspendiert und der Vorgang drei Mal wiederholt. Jedes Pellet wurde in 40 μl Blaupuffer mit 10 % β -Mercaptoethanol resuspendiert und bei 95 °C für 5 min gekocht. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt konnte der Überstand (15 μl) für die SDS-Page verwendet werden.

2.2.4. DIE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, kam die Elektrophorese mit vertikalen Minigelen (8 x 12 cm) in der Mini Protean 3 Elektrophoreseeinheit der Firma Biorad zum Einsatz. Die Gele wurden als diskontinuierliche Gele gegossen, welche aus einem Sammel (pH = 6,8)- und einem Trenngel (pH = 8,8) bestanden. Die Acrylamidkonzentration für das Sammelgel betrug 4 %, für das Trenngel 7,5 %. Vor jeder Anwendung wurden die Gele frisch gegossen. Hierfür musste die Acrylamid-Stammlösung mit dem Tris-HCl Puffer und destilliertem Wasser gemischt und unmittelbar vor dem Gießen APS (10 %) und TEMED dazugegeben werden, um die Polymerisation auszulösen. Nach Einfüllen dieser Lösung in die Gelkammern und der abgeschlossenen Polymerisation wurden die Gele in die Laufkammer eingebracht und mit 1 x Laufpuffer überschichtet. Ein Molekulargewichtsstandard wurde mit den Proben in die Taschen des Gels aufgetragen. Danach erfolgte die Elektrophorese von gleichzeitig zwei Gelen bei 80 V, bis die Laufront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Anschließend wurde eine Spannung von 120 V für 2 h 40 min (zur ErbB2-Detektion) bzw. 90 min (zur Analyse des PTEN-Proteins) angelegt.

2.2.5. DER WESTERN-BLOT

Zum Transfer der Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran kam die Technik des „Semi-Trocken-Blottings“ zwischen Elektrodenplatten der Fast-Blot-Apparatur der Firma Biorad zum Einsatz. Dazu musste das Gel vorsichtig von den Elektrophoreseglasplatten abgelöst und für mindestens 5 min in Anodenpuffer II eingelegt werden. Die vorher zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde für 10 min in Methanol und anschließend für 10 min in Anodenpuffer II benetzt. Für jedes Gel mussten je zwei Whatmann Filterpapiere kurz mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer befeuchtet werden. Danach konnten die verschiedenen Schichten auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur aufgelegt werden. Folgende Tabelle soll den Aufbau verdeutlichen:

----- Kathode -----
2 Whatmann Filterpapiere getränkt in Kathodenpuffer
Polyacrylamidgel
PVDF-Membran
2 Whatmann Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer II
2 Whatmann Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer I
+++++ Anode +++++

Tab. 3: Anordnung des Polyacrylamidgels, der PVDF-Membran und der Whatmann-Filterpapiere in der Blotting-Apparatur

Nach Abschluss der Schichtung wurde die Blotting-Apparatur geschlossen und bei einer Stromstärke vom 1 mA/cm² (bei der hier verwendeten Gel-Größe: 230 mA) für 1 h geblottet.

2.2.6. DER NACHWEIS DER PROTEINE MITTELS CHEMOLUMINESZENZ

Im Anschluss an das Blotting wurden die PVDF-Membranen zur Absättigung freier Bindungsstellen für 2 h bei Raumtemperatur in AP-T-Puffer/3% BSA leicht geschüttelt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in AP-T-Puffer/3% BSA im Kühlschrank bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die PVDF-Membranen 6 x 20 min in AP-T-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu beseitigen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (z.B. anti-rabbit-HRP, Cell Signaling) in AP-T-Puffer über 1 h. Wiederum musste ungebundener, überschüssiger Antikörper durch Waschen in AP-T-Puffer über 20 min beseitigt werden.

Danach wurden die Membranen mit der Proteinseite nach oben auf eine saubere, durchsichtige Kunststofffolie gelegt. Zur Detektion der Antikörper/Antigen-Komplexe wurde das ECL (enhanced chemiluminescence)- System von Amersham benutzt.

Das System basiert auf der Technik der Chemolumineszenz. Dabei oxidiert die am Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase unter Katalyse von H₂O₂ das Luminol, wodurch Licht freigesetzt wird. Hierzu wurden 1,95 ml von Reagenz A des Detektions-Kits mit 50 µl des Reagenz B vermischt und auf die PVDF-Membran auftragen. Nach einer Wartezeit von 2 min wurde das Detektionsgemisch entfernt und die Proteinseite mit einer zweiten Folie luftblasenfrei abgedeckt. Für die weitere Detektion wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf die trockene Folie aufgelegt, für einige Sekunden exponiert und der Röntgenfilm in die Entwicklermaschine eingegeben.

Falls Proteine mit Antikörpern anderer Spezifität detektiert werden sollten, konnte der auf der Membran gebundene Primärantikörper durch einen Waschschrift in 0,1 mM Glycin (pH 2,5) bei leichtem Schütteln über 20 min entfernt werden. Allerdings war eine neuerliche Blockade in AP-T-Puffer/3% BSA über 120 min notwendig, bevor die Membran mit einem neuen Primärantikörper inkubiert und der Detektionsprozess, wie oben beschrieben, wiederholt werden konnte.

2.2.7. DIE DENSITOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG

Mittels eines Densitometers konnte die Schwärzung des Röntgenfilmes als optische Dichte (OD) quantifiziert werden. Zur Auswertung der auf diese Weise gewonnenen Daten kam das Programm Image Quant V5.2 aus dem Programmpaket IQ Solutions V1.31 der Firma Amersham zum Einsatz. Die Banden der verschiedenen Spuren auf dem eingescannten Film mussten durch gleich breite Bereiche eingegrenzt werden. Die Software summiert die auf gleicher Höhe relativ zum festgelegten Bereich gemessene Schwärzung. Die Darstellung der Intensitäten erfolgt als Peak im Verlauf der Gelspur, deren Fläche sich mit Hilfe der Software berechnen lässt.

Die Werte für die Detektion des Phosphorylierungsgrades wurden auf die Werte der entsprechenden Banden für die Messung des Gesamt-Proteingehalts bezogen und anschließend auf die Kontrolle normiert. Dadurch entsteht ein Stimulierungsindex für die verschiedenen Wachstumsfaktoren im Vergleich zur Kontrolle.

2.2.8. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die einzelnen Phosphorylierungsstellen wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die Daten der Untersuchungen werden als Mittelwerte mit ihren dazugehörigen Standardabweichungen, welche im Programm Excel berechnet wurden, angegeben.

2.3. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

2.3.1. DER ZELLZYKLUS

Der Zellzyklus wird heute in die Phasen G1, S, G2 und M eingeteilt. In der M-Phase findet die definitive Zellteilung (Zytokinese) statt. Ein elementares Kennzeichen der S-Phase ist die semikonservative Replikation der DNA. In den Zellzyklus sind zwei Restriktionspunkte

integriert, einer in der G₁-Phase und ein zweiter zwischen der G₂- und der M-Phase. Wird die Selbstkontrolle in den Restriktionspunkten nicht bestanden, kann die Zelle in die G₀-Phase (Ruhephase) übergehen oder auch apoptotisch werden [60]. Eine Übersicht soll die nachfolgende Abbildung vermitteln:

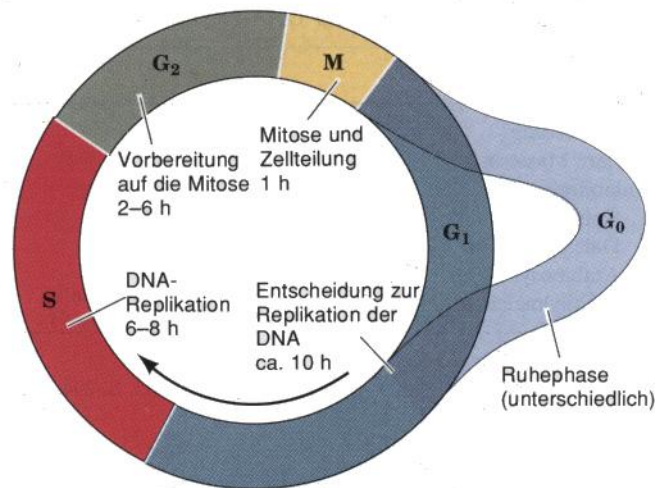


Abb. 5: Zellzyklus von Eukaryonten; Zellen in der G₁-Phase können in die G₀-Phase übergehen. Ein Restriktionspunkt befindet sich am Ende der G₁-Phase, ein Kontrollpunkt zwischen der G₂- und der M-Phase. Dargestellt sind die durchschnittlichen Zeiten der einzelnen Phasen [WVCH].

2.3.2. ZELLGEWINNUNG FÜR DIE EINPARAMETRISCHE DNA-FÄRBUNG

Zur Zellpräparation wurden eine Million geerntete Zellen 2 x in PBS/0,01 % NaN₃ gewaschen und anschließend in 1 ml kaltem, 70 %-igem Methanol für 1 h bei 4 °C fixiert. Danach wurden zwei weitere Waschschrte in PBS/0,01 % NaN₃ durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C mit 425 µl PBS/0,01 % NaN₃ und 50 µl RNase A (Stammlösung: 1 mg/ml, 50 – 100 Units/mg) für 20 min. Danach wurden 25 µl Propidiumiodid aus einer 1 mg/ml Stammlösung (PI-Endkonzentration: 50 µg/ml) zugegeben und das Vermischen durch ein kurzes Vortexen unterstützt. Schließlich konnten die Proben im Durchflusszytometer FACSCalibur gemessen werden.

2.3.3. DAS DURCHFLUSSZYTOMETER FACSCALIBUR

Für die Laseranregung im FACSCalibur stehen zwei Laser zur Verfügung, ein luftgekühlter Argon-Ionenlaser (488 nm, Leistung 15 mW) und ein roter Diodenlaser (ca. 635 nm). Beide Laser werden auf verschiedene Ebenen entlang des Flüssigkeitsstroms fokussiert und die entsprechenden Fluoreszenzemissionen der Proben räumlich und zeitlich voneinander getrennt detektiert. Das Signal, welches durch den roten Laser generiert wird, wird relativ zu dem Signal

des blauen Lasers verzögert, wodurch die zeitliche Differenz ausgeglichen werden kann und somit die beiden Signale gemeinsam ein und derselben Zelle zugeordnet werden können [45]. Mit dem System im Durchflusszytometer FACSCalibur ist es möglich, bis zu vier Fluoreszenzen (FL1 – FL4) gleichzeitig zu messen. Dabei wird ausgenutzt, dass sich unterschiedliche Farbstoffe bei einer gleichen Wellenlänge anregen lassen, aber ein für den Farbstoff spezifisches Emissionsmaximum besitzen. Deshalb kann man sie bei unterschiedlichen Wellenlängen detektieren. Der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff Propidiumiodid besitzt ein Absorptionsmaximum von 536 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm. Seine Anregungswellenlinie liegt bei 488 nm. Die Detektion erfolgte im Detektionskanal FL3 des Durchflusszytometers. Dabei kam ein Interferenzfilter zum Einsatz, der als Langpassfilter (LP) Licht ab einem Wellenbereich von 670 nm (670 LP) passieren ließ.

2.3.4. DIE STANDARDSOFTWARE UND DIE GRAPHISCHE DARSTELLUNG

Sämtliche Messungen mit dem FACSCalibur erfolgten an einem Macintosh G3 Computer mit der Software CELLQuest (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Die zu jedem Ereignis gemessenen Rohwerte wurden als *list-mode* Datenfile FCS 2.0 (Flow Cytometry Standard 2.0) abgespeichert und anschließend zur weiteren Bearbeitung auf einen Standard-PC übertragen. Die einparametrischen Daten zur Zellzyklusverteilung wurden mit der Software Expo32 v1.2 und WinCycle32, Version 11.05.02 beta (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA) ausgewertet.

Bei einem einzelnen Parameter wird ein Histogramm verwendet, bei dem die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität der Färbung auf der x-Achse aufgetragen wird. Im Sinne der einparametrischen DNA-Färbung wurde die Zellzyklusverteilung mit dem Programm WinCycle32 mit einer S-Phasenbestimmung nullter Ordnung berechnet. Diese Methode erlaubt die Ermittlung der Peaks der Zellzyklusphasen G0/G1 bzw. G2/M symmetrisch nach der Gauss-Verteilung und ordnet unter der Annahme von geringen Überlappungen den dazwischen liegenden Bereich der S-Phase-Fraktion zu [46]. Pulsprozessoren wurden bei einer einparametrischen DNA-Messung verwendet, um Zelldoubletten von einer Messung auszuschließen. Die Pulsprozessoren erlauben es, die Signal-Intensität, die Dauer eines Signals und das Integral des Peaks zu messen. Doubletten übersteigen aufgrund ihrer Größe die Dimensionen des Laserstrahls und benötigen im Vergleich zur Einzelzelle mehr Zeit, um durch den Laserstrahl zu wandern. Somit liefern sie ein größeres Weitensignal als Einzelzellen mit der gleichen Fluoreszenzmarkierung. Mittels einer adäquat gesetzten Region in

einer Auftragung von Signal-Weite gegen Signal-Fläche flossen für eine Darstellung und Berechnung des DNA-Gehalts ausschließlich Einzelzellen ein.

2.4. IMMUNHISTOCHEMIE

2.4.1. DAS PRINZIP DER IMMUNHISTOCHEMIE

Die Immunhistochemie nutzt die Eigenschaften eines Antikörpers, der mit hoher Spezifität und Affinität an ein Antigen binden kann. Somit ist eine präzise Lokalisation von Epitopen gesuchter Antigene in Zellen und Geweben möglich.

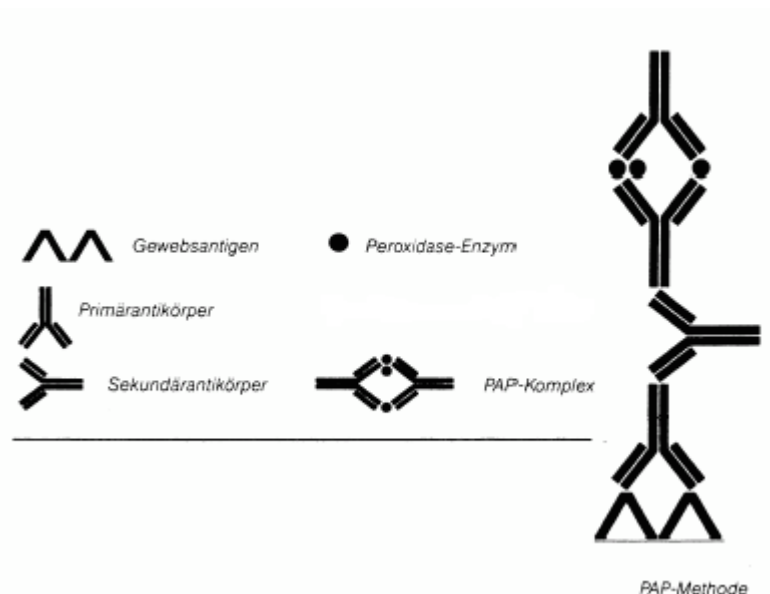


Abb. 6: Schematische Darstellung der PAP-Methode. An ein gesuchtes Gewebsantigen bindet ein Primärantikörper mit seinen Fab-Antigen-Bindungsstellen. Ein Sekundärantikörper (Brückenantikörper) bindet mit einem freien Fab-Fragment an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Das andere freie Fab-Fragment dient der Bindung des PAP-Komplexes, der aus Antikörpern besteht, die mit ihren Fab-Fragmenten das Enzym Peroxidase gebunden halten. [Eigenzusammenstellung]

Zuerst müssen die Antigene (hier: PTEN-Protein) im histologischen Paraffin-Schnitt nach Entparaffinierung durch geeignete Verfahren (Mikrowellen-Vorbehandlung) demaskiert werden. Danach wird ein erster Antikörper (Primärantikörper) hinzugefügt, der spezifisch an das zu untersuchende Antigen bindet. Ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) wird aufgetragen, der an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet. Der Sekundärantikörper ist unkonjugiert und wird bei dieser Methode auch als „Brückenantikörper“ bezeichnet (vgl. Abb. 6). Der nächste Schritt besteht aus der Zugabe des Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP)-Komplexes. Dieser besteht

aus Antikörpern, die mit ihren Fab-Fragmenten das Peroxidase-Enzym gebunden halten. Ihre freien Fc-Teile werden durch die Fab-Bindungsstellen des Sekundärantikörpers gebunden (vgl. Abb. 6). Diese Anordnung hat dem Verfahren den Namen Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode (PAP-Methode) verliehen.

Schließlich lässt man, um diesen Antikörperkomplex sichtbar zu machen, die Peroxidase mit einem passenden Chromogen (hier: Diaminobenzidintetrahydrochlorid, DAB) reagieren. Um die histologischen Strukturen darzustellen, führt man eine Gegenfärbung mit z.B. Hämatoxylin durch.

2.4.2. DIE UNTERSUCHTEN ZELLINIEN

Für die Immunhistochemie wurden die beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 zur Darstellung ihres PTEN-Gehalts herangezogen. Eine detaillierte Beschreibung der beiden Zelllinien findet sich in Kapitel 2.1.1. Als Negativkontrolle wurde die Mammakarzinomzelllinie BT549 verwendet, die aus der Literatur als PTEN-negative Zelllinie bekannt ist [47].

2.4.3. DIE GEWINNUNG VON ZELLPELLETS AUS DER ZELLKULTUR

Zur Gewinnung der Pellets für die Immunhistochemie wurden subkonfluent wachsende Monolayer verwendet. Die Zellen wurden, wie in Kap. 2.1.2. beschrieben, mit Hilfe von 0,25 % Trypsin/EDTA 0,1 % geerntet und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt. Danach erfolgte eine Zentrifugation über 3 min bei 1200 rpm. Um evtl. störende Zelltrümmer und andere Proteine zu beseitigen, wurden die Pellets mit PBS gewaschen und anschließend erneut für 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Zur Fixierung wurde 4-%iges, gepuffertes Formalin hinzugegeben und die Pellets über 24 h bei Raumtemperatur gelagert. Für die weitere Bearbeitung musste man die Zellen in ein 15 ml-Röhrchen überführen und über 8 min bei 1800 rpm abzentrifugieren. Die Spitze des Röhrchens mit dem Zellpellet wurde abgeschnitten und das offene Ende mit Filterpapier bedeckt. Danach erfolgte die Einbettung in das Einbettkörbchen. Die Pellets wurden mitsamt dem Einbettkörbchen zur kurzen Lagerung in 4-%iges, gepuffertes Formalin gelegt. Die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffin erfolgte vollautomatisch im *HyperCenter Excelsior* der Firma Shandon. Dabei wurden die Präparate je zweimal für 2 min in 70-%igen und dann in 96-%igen Ethanol, anschließend dreimal für 2 min in 100-%igen Ethanol überführt. Danach wurden die Präparate zweimal über 5 min mit Xylol behandelt. Schließlich erfolgte die Einbettung in

Paraffin bei 58°C. Die Präparate wurden dann mit einem Mikrotom ca. 1 bis 2 µm dick geschnitten, auf die Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

2.4.4. DIE VORBEREITUNG ZUR ANTIGENDARSTELLUNG

Um eine immunhistochemische Färbung durchführen zu können, ist es erforderlich, die entsprechenden Schnitte zu entparaffinieren. Dies geschieht durch Waschen mit frischem Xylol über 10 min bei 76°C. Anschließend wurde eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt, in der die Präparate je 2 min lang in 100-%igen, in 80-%igen und in 70-%igen Ethanol überführt wurden. Es erfolgte ein mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser.

Zur Demaskierung der Bindungsstellen für den Primärantikörper, wurden die Schnitte einer Mikrowellen-Vorbehandlung unterzogen. Dabei wurde Zitratpuffer (10 mM Zitronensäure / 10 mM Trinatriumcitrat; pH = 7,1) in der Mikrowelle auf 95°C erhitzt und die Objektträger 30 min lang in der kochenden Lösung inkubiert. Zum Abkühlen wurden die in Küvetten gelagerten Objektträger über ca. 20 min in ein Eiswasserbad gelegt. Es erfolgte anschließend ein mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser.

2.4.5. DIE ANTIGENDARSTELLUNG UND DIE GEGENFÄRBUNG

Für die Färbung der Präparate wurde das System „*cover-plates*“ der Firma Thermo verwendet. Grundlage dieser Anordnung ist die Bereitstellung eines Kapillarspalt für die Färbereagenzien. Zwischen Objektträger und *cover-plate* befindet sich ein kleiner Spalt, der ca. 50 µl an Volumen aufnehmen kann. Bei Zugabe von 100 µl Reagenz wird die Lösung, die sich gerade im Kapillarspalt befindet, nach unten herausgedrückt und somit komplett durch das neue Reagenz ersetzt. Mit diesem System kann das Gewebe nicht austrocknen und durch den Wasserfluss beim Waschschrift verringert man die Hintergrundfärbung.

Eine Übersicht über die sukzessiven Arbeitsschritte beim Färbevorgang soll Tab. 5 vermitteln:

Reagenz	Volumen [µl]	Inkubationszeit	Bemerkungen
Peroxidase von DAKO	100	3 min	Peroxidaseblockierung
Waschpuffer (1:10 verd.) von DAKO	1000	5 min	Waschen
anti-PTEN (138G6) Rabbit mAb von Cell Signaling (1:50 verd.)	100	30 min	Inkubation mit dem Primärantikörper
Waschpuffer (1:10 verd.) von DAKO	1000	5 min	Waschen
EnVision+ Dual Link System Peroxidase von DAKO	100	30 min	Inkubation mit dem Sekundärantikörper, Peroxidase
Waschpuffer (1:10 verd.) von DAKO	1000	5 min	Waschen
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System von DAKO	100	10 min	Entwicklung des Antigen-Antikörper-Komplexes
Aqua destillata	1000	2 min	Waschen
Hämatoxylin	100	2 min	Gegenfärbung
Leitungswasser	1000	5 min	Waschen

Tab. 4: Aufgeführt sind die einzelnen Arbeitsschritte des Färbevorgangs chronologisch von oben (Anfang) nach unten (Ende). In der ersten Spalte werden das verwendete Reagenz und die Herstellerfirma angegeben, in der zweiten das in das *cover-plate* eingebrachte Volumen des Reagenz und in der dritten Spalte die Inkubationszeit. Die Bemerkungen in der vierten Spalte sollen die Wirkung des verwendeten Reagenz verdeutlichen. verd. = verdünnt; mAb = monoklonaler Antikörper; DAB = Diaminobenzidintetrahydrochlorid

2.4.6. DIE KONSERVIERUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN PRÄPARATE

Zur Konservierung wurden die Objektträger über eine Minute lang in mit destilliertem Wasser gefüllte Küvetten gelegt. Anschließend wurde zur Entwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt, in der das Präparat jeweils zwei Minuten lang in 70-%igem, dann in 80-%igem, und zum Schluss in 100-%igem Ethanol eingelegt wurde. Im Anschluss daran erfolgte eine Behandlung über 2 x 5 min mit frischem Xylol. Schließlich konnte das Präparat mittels Entellan und einem Deckglas eingedeckelt werden.

2.4.7. DIE MIKROFOTOGRAPHIE

Sämtliche Beurteilungen von immunhistochemischen Färbungen an den Präparaten wurden mit einem Mikroskop der Firma Zeiss, Modell *AxioVert 200* durchgeführt. Als Lichtquelle für das

System diente die Halogenlampe *HAL 100* (12 V, 100W) der gleichen Firma. Die Photographien entstanden mit der Kamera *AxioCam MR 10* der Firma Zeiss. Sämtliche Aufnahmeparameter konnten mit der zugehörigen Kamarasoftware *AxioVision* eingestellt werden. So erfolgte auch die Bearbeitung und Archivierung der Bilder mit der Software.

2.5. MATERIALIEN

2.5.1. MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR

DMEM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO	Merck, Darmstadt
Einfriermedium	DMEM mit 10% FKS und 10% DMSO
FKS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
PBS	Biochrom AG, Berlin
Phenolrot	Biochrom AG, Berlin
Trypsin mit EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

2.5.2. ANTIKÖRPER

Primärantikörper

Trastuzumab (Herceptin™)	Genentech, South San Francisco, CA, USA
Pertuzumab	Genentech, South San Francisco, CA, USA
<i>rabbit anti-human</i> HER2/ErbB2 (29D8), polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
<i>rabbit anti-human</i> Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr877), polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
<i>rabbit anti-human</i> Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1248), polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
<i>rabbit anti-human</i> PTEN, polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
<i>rabbit anti-human</i> PTEN (138G6), monoklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
<i>rabbit anti-human</i> Phospho-PTEN (Ser380), polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
<i>rabbit anti-human</i> Phospho-PTEN (Ser380/Thr382/383), polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
<i>Rabbit anti-human</i> β -Actin (13E5), monoklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA

Sekundärantikörper

<i>goat anti-rabbit</i> HRP-konjugierter Antikörper, polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
---	---

2.5.3. DNA-FARBSTOFFE; ENZYME UND WACHSTUMSFAKTOREN

DNA-Farbstoffe

Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
----------------	--

Enzyme

RNase Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Wachstumsfaktoren

EGF, rekombinant vom Menschen (MG 6023 kDa) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
 HRG, Isoform β 1, rekombinant vom Menschen R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Molekulargewichtsstandard

Molekulargewichtsstandard Biorad Laboratories GmbH, München

2.5.4. GEBRAUCHSFERTIG ZUSAMMENGESTELLTE REAGENZIEN (KITS)

BCA-Protein-Assay-Kit Pierce, Niederlande
 ECL-plus Western-Blotting *Detection System* Amersham Biosciences, England
 EnVision + Dual Link System Peroxidase DakoCytomation, Hamburg

2.5.5. REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
ϵ -Amino-Capronsäure	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Acrylamid-Stammlösung (40%)	Roth, Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Biotest AG, Dreieich
EDTA	Serva, Heidelberg
Entellan	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Hematoxylin	DakoCytomation, Hamburg
Liquid DAB + Substrate <i>Chromogen System</i>	DakoCytomation, Hamburg
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
PMSF	AppliChem, Darmstadt
Paraffin	Merck, Darmstadt
<i>Precision Protein Standard</i>	Biorad Laboratories GmbH, München
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Proteaseinhibitor Cocktail 10x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Wash buffer 10 x	DakoCytomation, Hamburg
Xylol	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen
Zelllysepuffer	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA,

2.5.6. PUFFER UND LÖSUNGEN

DNA-Puffer	100 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	0,9 %	NaCl
	1 mM	CaCl ₂
	0,5 mM	MgCl ₂
	0,2 %	BSA (Zugabe kurz vor Gebrauch)
PBS	137 mM	NaCl
	6,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	2,7 mM	KCl
TE-Puffer	25 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	1 mM	EDTA
Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:		
Sammelgel (4%-ig)	3,05 ml	H ₂ O _{dest.}
	1,25 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
	50 µl	SDS (10 %)
	650 µl	Acrylamid-Stammlösung (40 %)
	25 µl	APS (10 %)
	5 µl	TEMED
Trenngel (7,5%-ig)	5,465 ml	H ₂ O _{dest.}
	2,5 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
	10 µl	SDS (10 %)
	1,875 ml	Acrylamid-Stammlösung (40 %)
	50 µl	APS (10 %)
	10 µl	TEMED
Laufpuffer 5×	20 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	195 mM	Glycin
	1 %	SDS
SDS-Probenpuffer 2×	20 %	Glycerin
	1,25 M	Tris-HCl (pH 6,8)
	4 %	SDS
	0,02 %	Bromphenolblau
	10 %	β-Mercaptoethanol (Zugabe kurz vor Gebrauch)
Anodenpuffer 1	300 mM	Tris-HCl (pH 10,4)
	20 %	Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM	Tris-HCl (pH 10,4)
	20 %	Methanol
Kathodenpuffer	40 mM	ε-Amino-n-Caprinsäure (pH 7,6)
	20 %	Methanol
AP-Puffer 10×	1 M	Tris-HCl (pH 7,4)
	1 M	NaCl
	25 mM	MgCl ₂

AP-T-Puffer	0,1 %	Tween 20 in AP-Puffer 1×
PMSF-Stammlösung	100 mM	in Isopropanol (-20°C)
Zellysepuffer	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	1 mM	Na ₂ EDTA
	1 mM	EGTA
	1 %	Triton-X 100
	2,5 mM	Natriumpyrophosphat
	1 mM	β-Glycerophosphat
	1 mM	Natriumvanadat
	1 µg/ml	Leupeptin
	1 mM	PMSF (Zugabe kurz vor Gebrauch)
	1:10 verd.	Proteaseinhibitor 10× (Zugabe kurz vor Gebrauch)

2.5.7. VERBRAUCHSMATERIAL

Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Gewebe-Kulturflaschen T25 (100 ml)	Greiner, Solingen
Gewebe-Kulturflaschen T75 (250 ml)	Greiner, Solingen
Gewebe-Kulturflaschen T175 (600 ml)	Greiner, Solingen
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech, England
Kryoröhrchen	Greiner, Solingen
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Objektträger	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Polystyrol Rundbodenröhrchen 5 ml	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran	Roche Diagnostics, Mannheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Trägerflüssigkeit FACSFlow	BD Biosciences, Heidelberg
Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt
Zellschaber	Greiner, Solingen
Zellsiebe - <i>Cellstrainer</i>	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Solingen

2.5.8. GERÄTE

Beschallungsgerät Labsonic U	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Biorad 200/2,0 <i>Constant Voltage</i>	Biorad Laboratories GmbH, München
Cover-Plates	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hiz GmbH, Hamburg
Halogenleuchte <i>HAL 100</i>	Carl Zeiss AG, Jena
HyperCenter Excelsior	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Sepatech, Osterode
Kamera <i>AxioCam MR 10</i>	Carl Zeiss AG, Jena
Labovort FS	Leitz Messtechnik GmbH, Wetzlar
Magnetrührer RCT <i>basic</i>	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop <i>AxioVert 200</i>	Carl Zeiss AG, Jena
Schlittenmikrotom	Micron International GmbH, Waldorf
MilliQ <i>Water System</i>	Millipore S. A., Molsheim, Frankreich
Mini Protean 3 Elektrophorese-Einheit	Biorad Laboratories GmbH, München

Einfriergerät NICOOL LM 10
pH-Meter WTW pH522

Pulsflächenanalysegerät Casy1 Model TCC
Sterilbank LaminAir HBB 2472 S
Unimax 1010

Vortex REAX 2000

Waage Sartorius R16OP

Wasserbad GFL 1083

Western-Blot Kammer

Whatman Filterpapier

Zentrifugen: Tischzentrifuge *Centrifuge* 5415
Tischzentrifuge Biofuge pico
Megafuge 1.0 R
Varifuge 3.2RS

Air Liquide, Düsseldorf

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH &
Co, Weilheim

Schärfe System, Reutlingen

Heraeus Sepatech, Osterode

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Heidolph Instruments, Schwabach

Sartorius, Göttingen

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Biometra, Göttingen

Laborcenter, Nürnberg

Eppendorf, Hamburg

Heraeus Sepatech, Osterode

Heraeus Sepatech, Osterode

Heraeus Sepatech, Osterode

3. ERGEBNISSE

3.1. SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT-UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOSPHORYLIERUNG DES ERBB2-REZEPTORS

Die Antwort einer Zelle auf einen extrazellulären Stimulus wird durch ein von Liganden und Dimerisierungspartnern abhängiges Phosphorylierungsmuster an den intrazellulären Tyrosinstellen der ErbB-Rezeptoren und der dadurch festgelegten Abstimmung verschiedener Signaltransduktionswege vermittelt.

Um die Wirkung des therapeutischen Antikörpers Pertuzumab auf die beiden Mammakarzinomzelllinien BT474 und SK-BR-3 zu untersuchen, wurde bei zwei wichtigen Phosphorylierungsstellen (pY877 und pY1248) mittels phosphospezifischer Antikörper mit der Western-Blot-Technik der Phosphorylierungsgrad nach Stimulierung mit EGF, Heregulin und Pertuzumab alleine und in der Kombination analysiert.

Die beiden Phosphotyrosine 877 und 1248 haben für die nachgeschaltete Signaltransduktion eine unterschiedliche Bedeutung (siehe Tab. 5). Der Tyrosinrest 877 befindet sich in der Kinasedomäne des ErbB2-Rezeptors. Es wird angenommen, dass eine durch die Src-Kinase vermittelte Phosphorylierung an dieser Stelle die Tyrosinkinaseaktivität des ErbB2-Rezeptors positiv reguliert wird [48]. Der Aminosäurerest Y1248 stellt eine der Hauptautophosphorylierungsstellen des ErbB2-Rezeptors dar und vermittelt durch die Bindung des Adapterproteins Shc über die Ras-MAPK-Kaskade Signale zur Stimulation der Zellproliferation [49].

Phosphorylierungsstelle des ErbB2	Mechanismus der Phosphorylierung	Bindungsproteine	Funktion der Phosphorylierungsstelle
Y877	Src-Kinase	---	Regulation der Rezeptoraktivität
Y1248	Autophosphorylierung	Shc (Adaptoprotein)	Ras-MAPK => Proliferation

Tab. 5: Phosphorylierungsstellen Y877 und Y1248 des c-erbB2-Rezeptors. Die Phosphorylierung am Y877 erfolgt durch die Src-Kinase, Y1248 ist eine Autophosphorylierungsstelle. Es sind die spezifisch an die phosphorylierten Tyrosinreste bindenden Proteine angegeben und die Funktion der entsprechenden Signaltransduktion aufgeführt.

3.1.1. DIE ERBB2-PHOSPHORYLIERUNG AM TYROSIN 877

In Abb. 7A sind repräsentative Western-Blots zur Analyse des Phosphorylierungsgrades am Tyrosin 877 des ErbB2 für BT474 und SK-BR-3 (jeweils obere Teilabbildung) dargestellt. Die untere Teilabbildung enthält die Detektion des ErbB2-Gesamtproteingehalts. Die Abb. 7B enthält die densitometrische Auswertung aus drei Mal mit unterschiedlichen Proteinlysaten durchgeführten, voneinander unabhängigen Western-Blot-Untersuchungen. Die Anordnung der Abbildungen für die Phosphorylierungsstelle 1248 des ErbB2 erfolgt in analoger Weise (vgl. Abb. 8A und 8B).

Um die Bandenschwärzung der Western-Blots und damit die Phosphorylierung relativ zur Rezeptormenge zu quantifizieren, wurden sowohl die Phosphotyrosin- als auch die Gesamt-ErbB2-Blots in jeder einzelnen Spur der Western-Blots densitometrisch vermessen. Es wurde dabei die Phosphorylierung relativ zum Gesamt-ErbB2-Gehalt gesetzt und auf den Wert der unstimulierten Zellen normiert.

Das Balkendiagramm in Abb. 7B zeigt für die Phosphorylierungsstelle Y877 den Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung aus der densitometrischen Auswertung der Western-Blots von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Bei BT474 (Abb. 7A, obere Teilabbildung) findet sich bei allen Stimulierungsmodi, die den Antikörper Pertuzumab enthalten (EGF/Pertuzumab, HRG/Pertuzumab, Pertuzumab), eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich verstärkte Phosphorylierung am Tyrosin 877 des ErbB2-Rezeptors. Durch die desitometrische Auswertung konnte die Zunahme der Phosphorylierung am Tyrosin 877 bei der Zelllinie BT474 quantifiziert werden. Am stärksten ist die Zunahme der Phosphorylierung bei der Kombination EGF und Pertuzumab (Abb. 7B, 3. grauer Balken) ausgeprägt, die um den Faktor 14 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zunimmt. Die zweitgrößte Zunahme der Phosphorylierung fand sich bei HRG und Pertuzumab (5. grauer Balken), hier stieg sie um das 12-fache des Ausgangswertes an. Die Stimulation mit Pertuzumab alleine (6. grauer Balken) führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung um den Faktor 10. Bei den übrigen Stimulierungsmodi (EGF, HRG) kann dagegen keine wesentliche Veränderung des Phosphorylierungsgrades gegenüber der unstimulierten Kontrolle erkannt werden (vgl. Abb. 7A u. 7B).

Bei der Zelllinie SK-BR-3 (Abb. 7A, untere Teilabbildung) bewirkt die Anwesenheit von Pertuzumab in der Zellbehandlung (EGF/Pertuzumab, HRG/Pertuzumab, Pertuzumab), ähnlich wie bei der Zelllinie BT474, einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung am Tyrosin 877 des ErbB2-Rezeptors. Densitometrisch ist auch hier der stärkste Anstieg der Phosphorylierung für

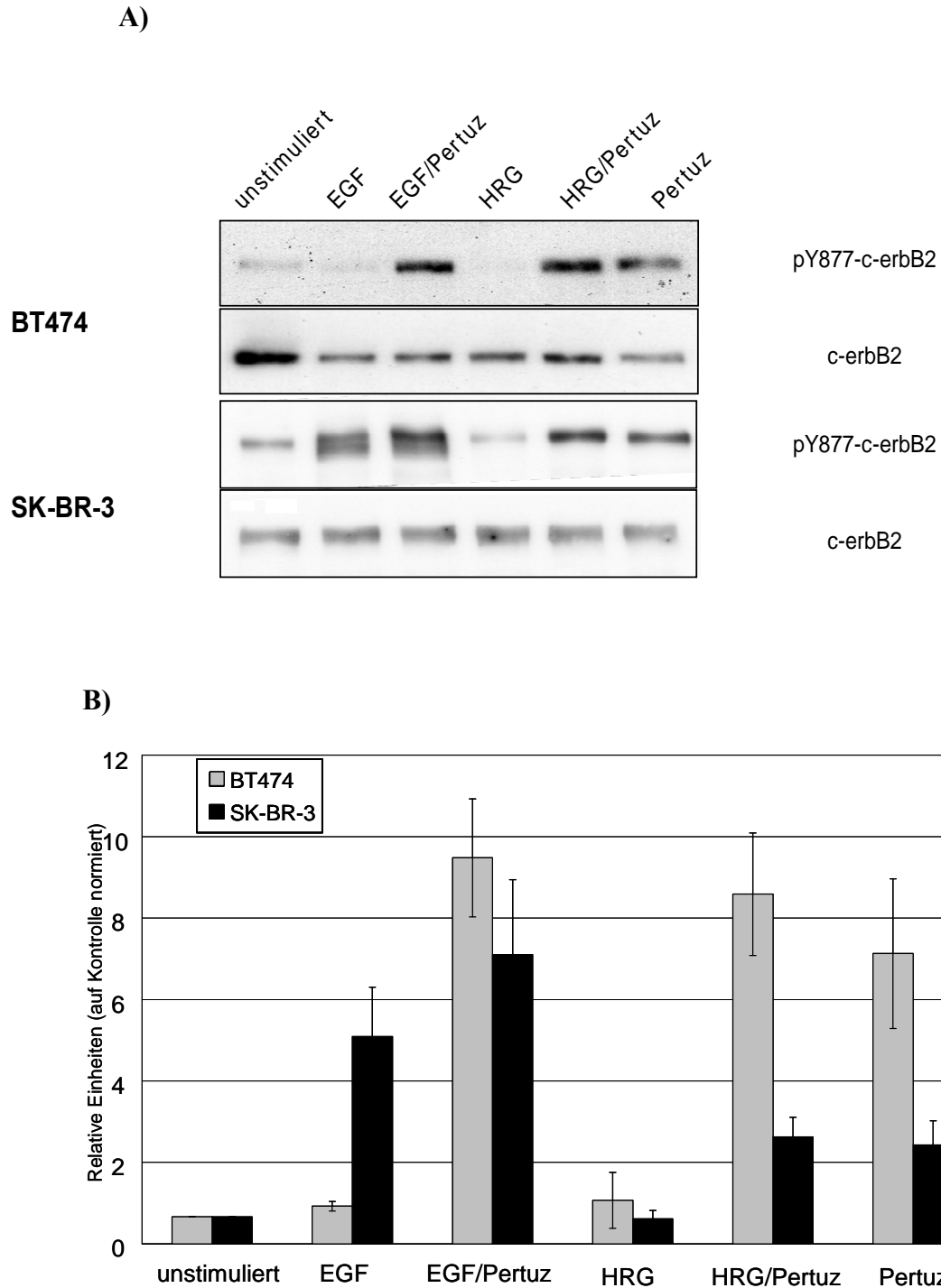


Abb. 7: A) Western-Blots mit Zelllysaten der Mammakarzinomzelllinien BT474 und SK-BR-3. Zur Darstellung kommt die vom Behandlungsmodus (unstimuliert, EGF, EGF/Pertuzumab, HRG, HRG/Pertuzumab bzw. Pertuzumab) abhängige Phosphorylierung von ErbB2 am Tyrosin 877 (jeweils obere Abbildung bei jeder Zelllinie). Der Ausschnitt jeweils unterhalb zeigt die Detektion eines parallel durchgeführten Western-Blots zum Nachweis des ErbB2-Gesamtproteins in jeder Spur.

B) Densitometrische Auswertung von drei Western-Blot-Untersuchungen zur Ermittlung der Wachstumsfaktor- und/oder Pertuzumab-induzierten Phosphorylierung am Tyrosin 877 des ErbB2 bei BT474 und SK-BR-3. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit drei unterschiedlichen Proteinlysaten durchgeführt und ausgewertet.

die Kombination EGF/Pertuzumab (Abb. 7B, 3. schwarzer Balken) zu verzeichnen, sie stieg hier um den Faktor 10,7. Die Stimulierung mit HRG und Pertuzumab (5. schwarzer Balken) führte zu einem Anstieg um das 3,9-fache, die Stimulation mit Pertuzumab ohne Kombinationspartner (6. schwarzer Balken) um das 3,6-fache. Eine Stimulierung mit HRG allein bewirkte keine signifikante Zunahme der Phosphorylierung. Im Gegensatz zu BT474 induziert die Behandlung mit EGF bei SK-BR-3 einen deutlich ausgeprägten Anstieg der Phosphorylierung um den Faktor 7,6. Allgemein betrachtet steigt die Y877-Phosphorylierung bei der Zelllinie BT474 stärker an als bei SK-BR-3.

3.1.2. DIE ERBB2-PHOSPHORYLIERUNG AM TYROSIN 1248

Die Abb. 8A zeigt repräsentative Western-Blots und die Abb. 8B deren densitometrische Auswertung zur Analyse der Phosphorylierung am Tyrosin 1248 des ErbB2-Rezeptors bei den Mammakarzinomzelllinien BT474 und SK-BR-3.

Bei BT474 lässt sich, ähnlich wie bei der Phosphorylierungsstelle 877, ein steiler Anstieg der Phosphorylierung des Y1248 bei allen Stimulierungsmodi, die den Antikörper Pertuzumab (EGF/Pertuzumab, HRG/Pertuzumab, Pertuzumab) beinhalten, erkennen (vgl. Abb. 8A). Quantitativ lässt sich bei der Kombination EGF/Pertuzumab (Abb. 8B, 3. grauer Balken) ein Anstieg der Phosphorylierung um den Faktor 10, bei der Kombination HRG/Pertuzumab (Abb. 8B, 5. grauer Balken) um den Faktor 10,3 feststellen. Die alleinige Stimulierung mit Pertuzumab (Abb. 8B, 6. grauer Balken) führte zu einem Anstieg um das 10,5-fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die übrigen Stimulationsmodi (EGF, HRG) führten zu keiner signifikanten Änderung des Phosphorylierungsgrades des Y1248 im Vergleich zum basalen Level. Anders verhält es sich bei der Zellreihe SK-BR-3. Auch hier führen die Stimulationsmodi mit dem Antikörper Pertuzumab (EGF/Pertuzumab, HRG/Pertuzumab, Pertuzumab) zu einem erkennbaren, aber im Vergleich zu BT474 deutlich schwächeren Anstieg der Phosphorylierung des Tyrosins 1248 des c-erbB2-Rezeptors (Abb. 8A, untere Teilabbildung). Zum größten Anstieg um das 1,96-fache führt die Kombination EGF/Pertuzumab (Abb. 8B, 3. schwarzer Balken). Die Stimulation mit der Kombination aus HRG und Pertuzumab (Abb. 8B, 5. schwarzer Balken) führte zu einem Anstieg um die Faktor 1,54 und die Zellbehandlung mit Pertuzumab alleine zur Zunahme der Phosphorylierung um das 1,27-fache. Ähnlich wie beim Y877 und im Gegensatz zu BT474 führt die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF bei SK-BR-3 (Abb. 8b, 2. schwarzer Balken) zu einer Zunahme der Phosphorylierung des Y1248 um das 1,57-fache.

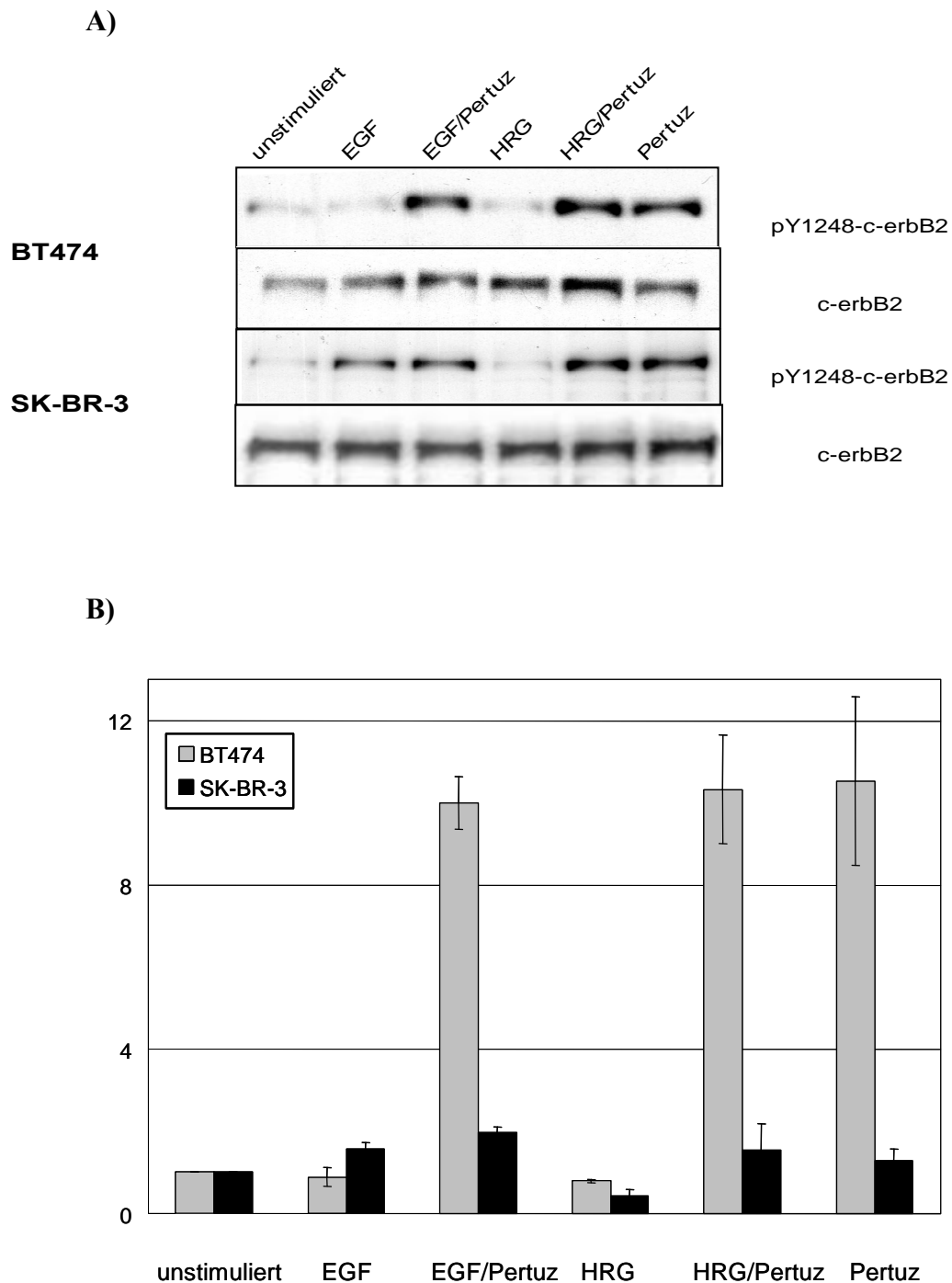


Abb. 8: A) Western-Blots mit Zelllysaten der Mammakarzinomzelllinien BT474 und SK-BR-3. Zur Darstellung kommt die vom Behandlungsmodus (unstimuliert, EGF, EGF/Pertuzumab, HRG, HRG/Pertuzumab bzw. Pertuzumab) abhängige Phosphorylierung von ErbB2 am Tyrosin 1248 (jeweils obere Abbildung bei jeder Zelllinie). Der Ausschnitt jeweils unterhalb zeigt die Detektion desselben Western-Blots zum Nachweis des ErbB2-Gesamtproteins in jeder Spur.

B) Densitometrische Auswertung von drei Western-Blot-Untersuchungen zur Ermittlung der Wachstumsfaktor- und/oder Pertuzumab-induzierten Phosphorylierung am Tyrosin 1248 des ErbB2 bei BT474 und SK-BR-3. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit drei unterschiedlichen Proteinlysaten durchgeführt und ausgewertet.

Beim Behandlungsmodus mit HRG alleine (Abb. 8B, 4. schwarzer Balken) ist eine Abnahme der Phosphorylierung des Tyrosin 1248 auf das 0,42-fache zu verzeichnen. Insgesamt gesehen ist auch hier der Anstieg der Phosphorylierung bei SK-BR-3 schwächer ausgeprägt als bei BT474.

3.2. STATISCHE ZELLZYKLUSANALYSE

Um die Wirkung der beiden therapeutischen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab auf die Inhibition der Proliferation der beiden Mammakarzinomzelllinien BT474 und SK-BR-3 zu untersuchen, wurde mittels Durchflusszytometrie die S-Phase-Fraktion (SPF) bestimmt, die Auskunft über den Prozentsatz der proliferierenden Zellen in Bezug auf das Gesamtzellzahl erteilt. Die Zellen wurden, wie in Abb. 9 und Abb. 10 gezeigt, mit den beiden therapeutischen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab behandelt. Eine unstimulierte Probe diente, ebenso wie ein Ansatz mit dem Wachstumsfaktor EGF, als Kontrolle. Die durchflusszytometrische Analyse der S-Phase-Fraktion fand nach 18 Stunden (früher Zeitpunkt) und nach 48 Stunden (später Zeitpunkt) statt. Wiederum wurden für jede Zelllinie drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

3.2.1. DIE S-PHASE-FRAKTION VON BT474 NACH ANTIKÖRPERBEHANDLUNG

Bei der Zelllinie BT474 (vgl. Abb. 9) befinden sich 20,7 % der Zellen ohne vorangegangene Behandlung (weißer Balken) nach 18 h in der S-Phase. Zum Messzeitpunkt nach 48 h sind 21,3 % der Zellen in der S-Phase, so dass bei unstimuliertem Modus von einer relativ konstanten Zellproliferation ausgegangen werden kann. Die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF (grüner Balken) führt zu einem drastischen Anstieg der S-Phase-Fraktion um 200 % auf 44,2 % nach 18 h. Bei der Messung nach 48 h ist dieser Effekt nicht mehr zu erkennen, hier bewegt sich die Zellproliferation nach EGF-Behandlung auf dem gleichen Level im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Zellbehandlung mit dem Antikörper Pertuzumab (hellblauer Balken) führt zu einer leichten aber signifikanten Abnahme der SPF auf 17 % nach 18 h. Zum späteren Messzeitpunkt (nach 48 h) ist die SPF mit 18,6 % im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls reduziert. Eine stärkere Inhibition der Zellproliferation ist bei dem Stimulationsmodus mit dem Antikörper Trastuzumab (dunkelblauer Balken) zu erkennen, die SPF sinkt auf 11,3 % nach 18 h und 9,9 % nach 48 h. Dies entspricht im Vergleich zum Ausgangswert von 20,7 % bei der unstimulierten Kontrolle einer Reduktion um 47,8 %. Die Kombination der beiden therapeutischen Antikörper

Pertuzumab und Trastuzumab (orange-farbener Balken) führt nach 18 h zu einer Abnahme der SPF auf 11,8 % und nach 48h auf 4,7 %. Somit kann bei diesem Stimulationsmodus die stärkste Abnahme der SPF verzeichnet werden.

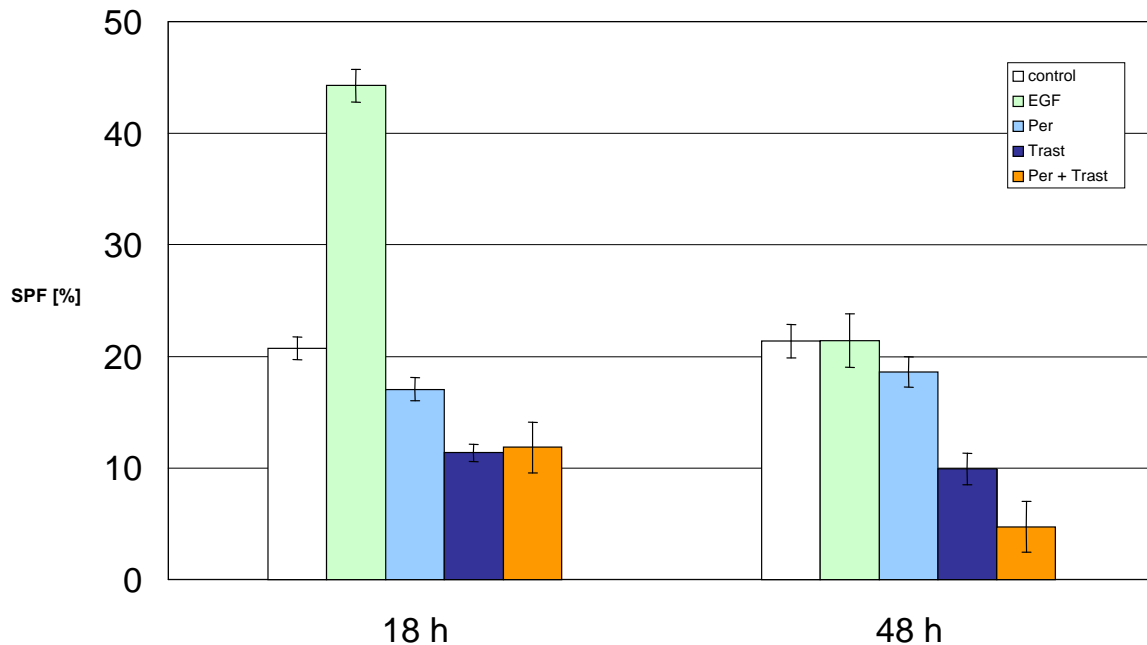


Abb. 9: Darstellung der S-Phase-Fraktion (SPF, Ordinate) im Balkendiagramm in % zu den Zeitpunkten 18 h und 48 h (Abszisse) nach Antikörperbehandlung der Zelllinie BT474. Die verschiedenen Farben der Balken repräsentieren die unterschiedlichen Stimulationsmodi: Kontrolle (weiß), EGF (grün), Pertuzumab (hellblau), Trastuzumab (dunkelblau), Pertuzumab und Trastuzumab (orange).

3.2.2. DIE S-PHASE-FRAKTION VON SK-BR-3 NACH ANTIKÖRPERBEHANDLUNG

Bei der statischen Proliferationsanalyse der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 befinden sich 23,4 % der unstimulierten Zellen (weißer Balken) nach 18 h in der S-Phase. Zum Zeitpunkt der Messung nach 48 h ist die SPF mit 20,2 % leicht verringert. Im Gegensatz zu BT474, führt bei SK-BR-3 eine 18-stündige Behandlung mit dem Wachstumsfaktor EGF (grüner Balken) zu einer Abnahme der S-Phase-Fraktion auf 7,6 % (18 h) bzw. auf 4,8 % (48 h). Eine Behandlung mit dem Antikörper Pertuzumab alleine (hell-blauer Balken) zeigt kaum eine Auswirkung auf die SPF. Lediglich ein leichter Rückgang von 23,4 % auf 22,1 % nach 18 h ist zu verzeichnen, bei der Messung nach 48 h bewegt sich die Zellproliferation auf nahezu dem gleichen Level (20,4 %) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (20,2 %). Eine Verringerung des Anteils der Zellen in der S-Phase kann durch eine Behandlung mit dem Antikörper Trastuzumab

(dunkelblauer Balken) beobachtet werden. Hier sinkt die S-Phase-Fraktion von 23,4 % auf 13,7 % nach 18 h und von 20,2 % auf 14,4 % nach 48 h. Beim Stimulationsmodus mit den beiden therapeutischen Antikörpern Pertuzumab und Trastuzumab in Kombination (oranger Balken) kann ebenfalls eine Abnahme der SPF von 23,4 % auf 13,9 % nach 18 h, bzw. von 20,2 % auf 12,2 % nach 48 h verzeichnet werden. Insgesamt gesehen zeigt sich bei der Kombinationsbehandlung mit beiden Antikörpern ein leichter additiver Effekt auf die Inhibition der Zellproliferation beim Messzeitpunkt nach 48 h.

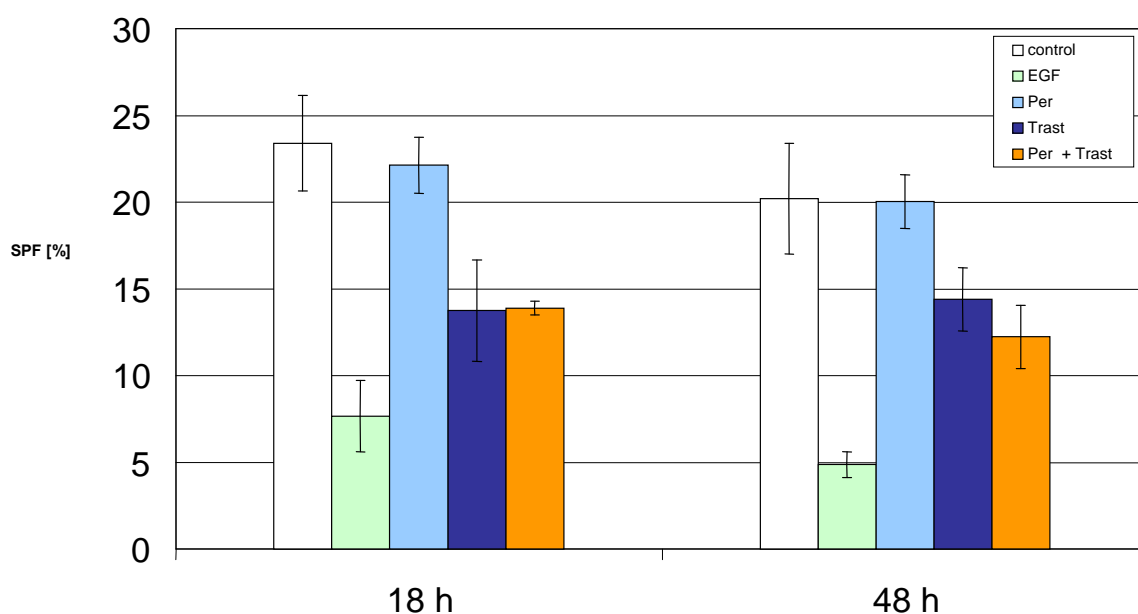


Abb. 10: Darstellung der S-Phase-Fraktion (SPF, Ordinate) im Balkendiagramm in % zu den Zeitpunkten 18 h und 48 h (Abszisse) nach Antikörperbehandlung der Zelllinie SK-BR-3. Die verschiedenen Farben der Balken repräsentieren die unterschiedlichen Stimulationsmodi: Kontrolle (weiß), EGF (grün), Pertuzumab (hellblau), Trastuzumab (dunkelblau), Pertuzumab und Trastuzumab (orange)

Im Vergleich der beiden, für diese Untersuchungen verwendeten Zelllinien, ist die Sensitivität gegenüber den therapeutischen Antikörpern (gemessen als Abnahme der SPF) bei der Zelllinie BT474 deutlich stärker ausgeprägt, als bei der Zelllinie SK-BR-3.

3.3. VERGLEICH DES PTEN-GEHALTS DER BEIDEN ZELLINIEN BT474 UND SK-BR-3

Eine Mutation im Gen des Tumorsuppressorproteins PTEN kann zu einem mangelndem Expressionslevel oder Expression von mutantern PTEN oder gar zum Verlust der Proteinaktivität

führen. Wie im Kapitel 1.3. beschrieben, wird eine mangelnde Expression oder Funktion von PTEN mit einer Resistenz gegen die Therapie mit Trastuzumab in Zusammenhang gebracht. Aufgrund der in Kap. 3.2. gezeigten unterschiedlichen Sensitivität von BT474 und SK-BR3 gegenüber der Behandlung mit den therapeutischen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab soll der Frage nachgegangen werden, ob zwischen den beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 ein Unterschied bezüglich des Gehalts an PTEN-Protein vorliegt, der diesem unterschiedlichen Verhalten gegenüber der Antikörperbehandlung beitragen kann. Um diese Frage zu beantworten, kamen einerseits die Western-Blot-Technik, andererseits die Immunhistochemie zum Einsatz.

3.3.1. WESTERN-BLOT-UNTERSUCHUNGEN ZUM VERGLEICH DES RELATIVEN PTEN-GEHALTS VON BT474 UND SK-BR-3

Um einen Vergleich des Gehalts an PTEN-Protein zwischen den beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 durchführen zu können, wurde mittels der Western-Blot-Technik der relative PTEN-Gehalt beider Zelllinien ermittelt. Das Zytoskelett-protein β -Aktin diene als Eichmarker für die entsprechende Gesamtproteinkonzentration in den einzelnen Spuren. Das β -Aktin wurde mit dem PTEN-Protein simultan auf einem Western-Blot detektiert. Wie auch bei den Untersuchungen zur Phosphorylierung des c-erbB2-Rezeptors wurden die einzelnen Western-Blots densitometrisch vermessen. Dabei ergab der Quotient aus PTEN / β -Aktin den relativen Gehalt an PTEN-Protein der jeweiligen Zelllinie. Es kamen zwei unterschiedliche Antikörper gegen das Gesamt-PTEN-Protein der Firma *Cell Signaling* zum Einsatz (vgl. Abb. 11A u. 11B).

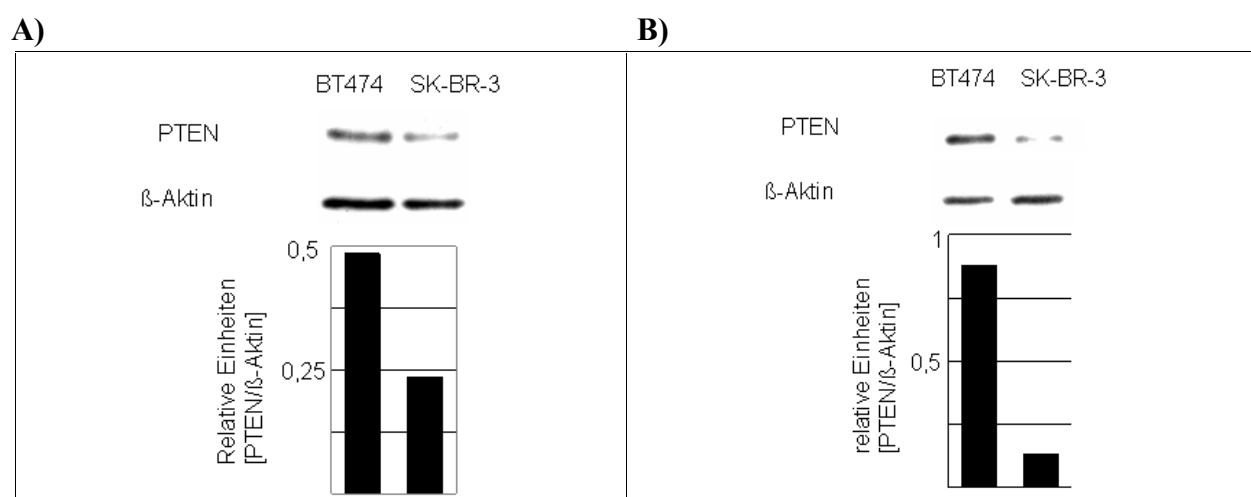


Abb. 11: Zur Darstellung kommen im oberen Bereich der Abbildungen A und B die Banden der jeweiligen Western-Blot-Detektion, die obere Reihe enthält die Detektion des Gesamt-PTEN-Proteins und die untere Reihe die des β -Aktins. Der densitometrisch ermittelte relative PTEN-Gehalt (Quotient aus PTEN und β -Aktin) wird anhand des Balkendiagramms dargestellt. Der linke Balken bezieht sich auf die Zelllinie BT474 und der rechte auf SK-BR-3.

In der Abb. A kam ein polyklonaler anti-PTEN-Antikörper, in der Abb. B der anti-PTEN-Antikörper (138G6) zum Einsatz.

In den Abbildungen 11A und 11B kann bei annähernd gleicher Intensität der β -Aktin-Eichbande eine deutlich stärkere Intensität der PTEN-Bande bei der Zelllinie BT474 erkannt werden, was für einen deutlich höheren Gehalt von PTEN-Gesamtprotein in der Zelllinie BT474 spricht.

Die densitometrische Auswertung des Western-Blots mit dem polyklonalen Antikörper *rabbit anti-human PTEN* der Firma *Cell Signaling* (Abb. 11A) zeigt, dass die Zelllinie SK-BR-3 etwa 48 % des PTEN-Gesamtproteingehalts der Zelllinie BT474 aufweist.

Bei der Verwendung des monoklonalen Antikörpers *rabbit anti-human PTEN* (138G6) des Unternehmens *Cell Signaling* (Abb. 11B) wird dieser Unterschied noch deutlicher. Hier weist die Zelllinie SK-BR-3 nur 15 % des PTEN-Gehalts der Zelllinie BT474 auf. So ergibt sich aus den Western-Blot-Untersuchungen, dass die Zelllinie BT474 einen drastisch höheren PTEN-Gehalt aufweist als die Zelllinie SK-BR-3.

3.3.2. IMMUNHISTOCHEMISCHE DARSTELLUNG DES PTEN-PROTEINS

Um den PTEN-Gehalt der beiden Zelllinien (BT474 und SK-BR-3) visuell und auf zellulärer Ebene darzustellen und die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen zu verifizieren, wurde eine immunhistochemische Färbung des PTEN-Proteins beider Zelllinien durchgeführt. Zur Negativkontrolle wurde die Mammakarzinomzelllinie BT549 herangezogen, bei der aus der Literatur [7] bekannt ist, dass diese weitgehend PTEN-negativ ist. Dafür wurden aus der Zellkultur Zellpellets gewonnen, fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Für die immunhistochemische Darstellung wurde ein gegen das Gesamt-PTEN-Protein gerichteter, monoklonaler Antikörper (138G6) der Firma *Cell Signaling* verwendet.

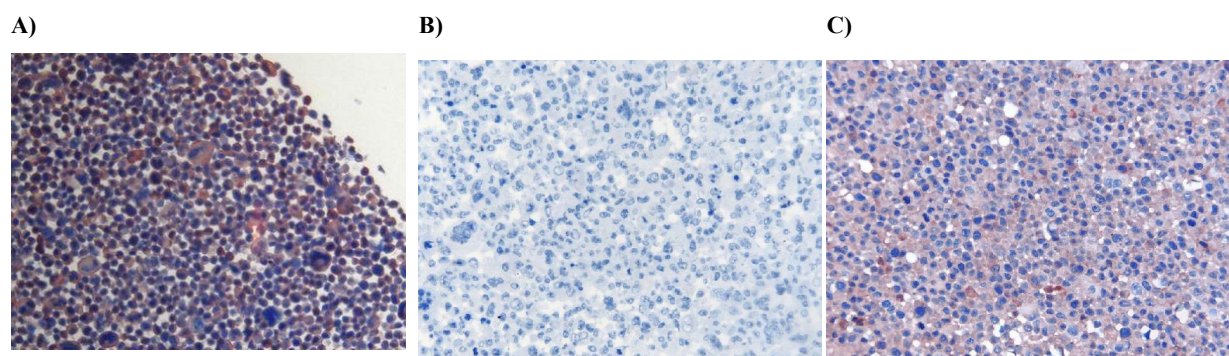


Abb. 12: Immunhistochemische Färbung des PTEN-Gesamtproteins bei BT474 (A), SK-BR-3 (B) und BT549 (C). Bedingt durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin ist das Zytoplasma hellblau und die Zellkerne dunkelblau angefärbt. Das PTEN-Protein ist an der braunen Farbe zu erkennen. Im Vergleich zueinander zeigen die Färbungen, dass BT474 (A) eine starke, SK-BR-3 (B) eine mittlere, und die Negativkontrolle BT549 (C) keine Expression des PTEN-Proteins aufweisen [Vergrößerung: 40 x].

In den drei Abbildungen 12A-C sind immunhistochemische Färbungen des PTEN-Proteins dargestellt. Erkennbar ist es an der Intensität der braunen Färbung des Zytoplasmas. Durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin ist das Zytoplasma der PTEN-negativen Zelllinie BT549 (Abb. 12C) hellblau angefärbt. Die Zellkerne aller Zelllinien sind aufgrund ihres Gehalts an negativer Ladung (DNA) dunkelblau angefärbt (Abb. 12A-C).

Bei der Betrachtung des PTEN-Proteingehalts der Zelllinien fällt deutlich auf, dass die Zelllinie BT474 (Abb. 12A) eine starke, die Zelllinie SK-BR-3 (Abb. 12B) eine mittlere und die Zelllinie BT549 (Abb. 12C) keine PTEN-Expression aufweist.

Somit bestätigt die immunhistochemische Darstellung die Ergebnisse aus den vorangegangenen Western-Blot-Analysen. Die Zelllinie BT474 besitzt einen deutlich höheren PTEN-Gehalt als die Zelllinie SK-BR-3.

3.4. SDS-PAGE UND WESTERN-BLOT-UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOSPHORYLIERUNG DES PTEN-PROTEINS

Es liegen Hinweise dafür vor, dass das PTEN-Protein eine wesentliche Rolle für das Ansprechen eines Tumors oder Tumorzelllinien auf die Antikörpertherapie mit Trastuzumab und Pertuzumab spielt [28]. Aus den vorherigen Ergebnissen geht hervor, dass die Zelllinie BT-474 mehr PTEN exprimiert als SK-BR-3 (s. Kap. 3.3.). Bei BT-474 ließ sich die Proliferation deutlich besser mit den zugegebenen Antikörpern inhibieren als bei SK-BR-3 (s. Kap. 3.2.). Um der Frage nachzugehen, ob allein die Quantität der Expression des PTEN-Proteins oder auch die Regulation des Proteins durch Phosphorylierung eine Rolle für das unterschiedliche Ansprechen der beiden Zelllinien auf die Antikörpertherapie spielt, wurden Western-Blot-Untersuchungen mit phosphospezifischen Antikörpern durchgeführt, ähnlich den Untersuchungen des Kap. 3.1.. Nach dem heutigen Stand der Forschung wird davon ausgegangen, dass das PTEN-Protein im phosphorylierten Zustand inaktiv ist, der PI3K-Akt-Signalweg ungehindert ablaufen, und somit einem mitogenen Reiz an das Zellinnere weiterleiten kann. Im umgekehrten Falle, der Dephosphorylierung des PTEN-Proteins, wird der PI3K-Akt-Weg blockiert [34].

Um den phosphorylierten vom dephosphorylierten Zustand des PTEN-Proteins zu unterscheiden, kam ein phosphospezifischer Antikörper der Firma *Cell Signaling* zum Einsatz, der gegen die drei Phosphorylierungsstellen Ser380, Thr282 und Thr283 des PTEN-Proteins gerichtet war. Auch bei diesen Versuchen wurde die Gesamtmenge des PTEN-Proteins im Verhältnis zum Phospho-PTEN ermittelt. Als Stimulationsmodi kamen die bisher verwendeten Ansätze, die in Kap. 2.1.3. (s. Tab. 2a u. 2b) ausführlich dargestellt sind, zum Einsatz.

Während der ersten Versuche stellte sich sehr schnell heraus, dass bei diesen Western-Blots deutlich störende Hintergründe auftreten, die eine korrekte Auswertung nahezu unmöglich werden lassen. Deshalb wurde der SDS-Gelelektrophorese jeweils eine Immunpräzipitation des PTEN-Proteins vorgeschaltet (s. Kap. 2.2.3.), die das Problem zu lösen vermochte.

3.4.1. DIE PTEN-PHOSPHORYLIERUNG AM SER380, THR282 UND THR283 NACH STIMULATION MIT DEM ANTIKÖRPER TRASTUZUMAB BEI BT474

Die Abb. 13 zeigt den Phosphorylierungsgrad des PTEN-Proteins der Mammakarzinomzelllinie BT474. Für diese Versuchsreihe wurde ausschließlich der Antikörper Trastuzumab verwendet. Man kann erkennen, dass die Zugabe des EGF nur einen mäßigen Anstieg der Phosphorylierung an den drei Phosphorylierungsstellen des PTEN-Proteins bewirkt (1,36-fach), auf dem gleichen Niveau bewegt sich die Stimulation mit EGF und Trastuzumab. Die Zugabe des Antikörpers bewirkt weder einen Anstieg noch ein Absinken des Phosphorylierungslevels. Die Stimulation mit Heregulin alleine lässt keine signifikante Änderung des Phosphorylierungsgrades im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erkennen. Hier lässt sich ein rasanter Anstieg der Phosphorylierung, um das 1,95-fache im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, durch die zusätzliche Antikörperbehandlung mit Trastuzumab erzielen. Die Trastuzumab-Stimulation alleine bewirkt ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung um das 1,77-fache.

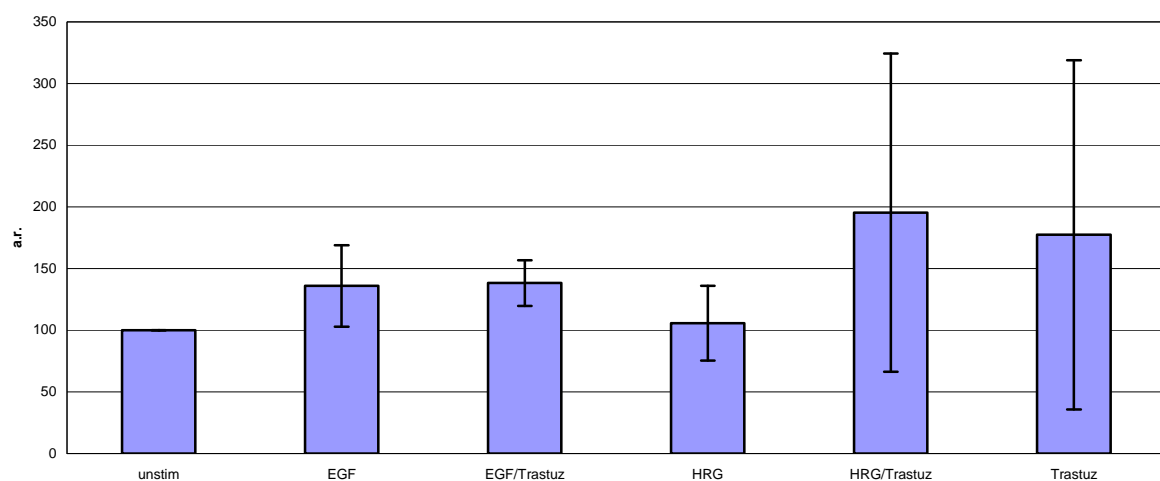


Abb. 13) Der Phosphorylierungsgrad des PTEN-Proteins bei BT474 an den drei Phosphorylierungsstellen Ser380, Thr282 und Thr283. Dargestellt ist die unstimulierte Kontrolle, sowie die Behandlungsmodi EGF; EGF/Trastuz, HRG; HRG/Trastuz und Trastuz ohne weiteren Stimulationspartner.

3.4.2. DIE PTEN-PHOSPHORYLIERUNG AM SER380, THR282 UND THR283 NACH STIMULATION MIT DEM ANTIKÖRPER PERTUZUMAB BEI BT474

Bei dieser Versuchsreihe wurden die identischen Lysate der gleichen Zelllinie (BT474) wie in den Experimenten vom vorherigen Kapitel (s.Kap. 3.4.1.) verwendet, mit dem Unterschied, dass der Antikörper Trastuzumab gegen den Antikörper Pertuzumab ausgetauscht wurde. Ähnlich wie in den Experimenten zuvor bewirkt hier die Zugabe von EGF als alleiniger Stimulus einen leichten Anstieg des Phosphorylierungsgrades des PTEN-Proteins um das 1,53-fache. Die zusätzliche Stimulation mit dem Antikörper Pertuzumab zu EGF führt wieder zu einem Absinken der Phosphorylierung knapp oberhalb des Ausgangsniveau der unstimulierten Kontrolle (s. Abb. 14). Der Stimulus Heregulin allein führt zu einem Anstieg des PTEN-Phosphorylierungsgrades um mehr als das Doppelte (2,25-fach). Die Kombination Heregulin und Pertuzumab lässt, wie die Stimulation mit dem Antikörper Pertuzumab alleine, die Phosphorylierung des PTEN-Proteins um das Doppelte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zunehmen.

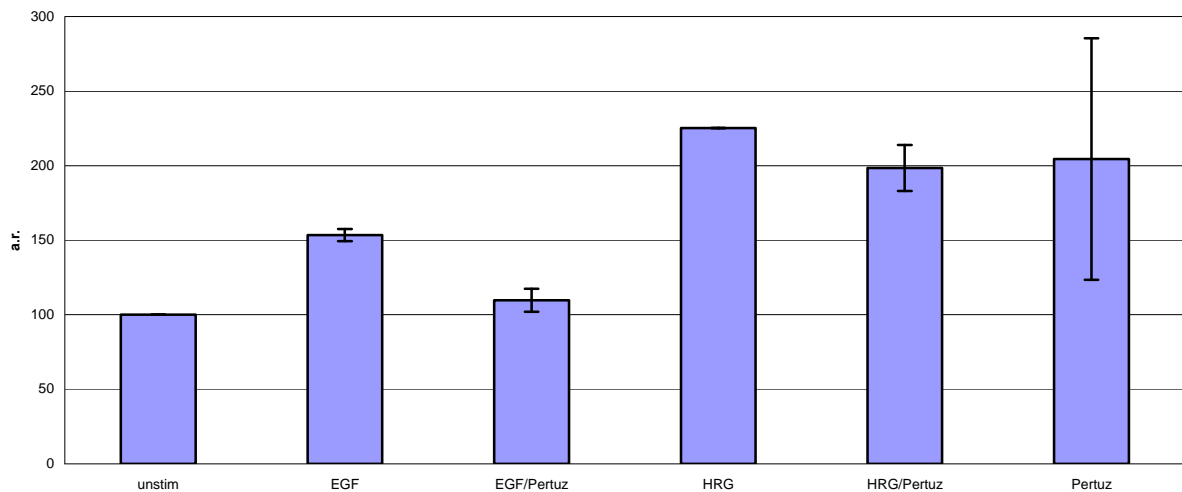


Abb. 14) Der Phosphorylierungsgrad des PTEN-Proteins bei BT474 an den drei Phosphorylierungsstellen Ser380, Thr282 und Thr283. Dargestellt ist die unstimulierte Kontrolle, sowie die Behandlungsmodi EGF; EGF/Pertuz, HRG; HRG/Pertuz und Pertuz ohne weiteren Stimulationspartner.

3.4.3. DIE PTEN-PHOSPHORYLIERUNG AM SER380, THR282 UND THR283 NACH STIMULATION MIT DEM ANTIKÖRPER TRASTUZUMAB BEI SK-BR-3

Die Versuche mit der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 zur PTEN-Phosphorylierung wurden mit den gleichen Modalitäten und Versuchsbedingungen durchgeführt, die bereits für die Zelllinie BT474 galten. Bei SK-BR-3 führt die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF zu einer leichten Zunahme der Phosphorylierung am PTEN-Protein (s. Abb. 15) um das 1,25-fache. Kombiniert man EGF jedoch mit dem therapeutischen Antikörper Trastuzumab, so ist ein enormer Anstieg um das 225-fache zu beobachten. Die drei anderen Stimuli (Heregulin; Heregulin/Trastuzumab und Trastuzumab alleine) bewirken lediglich einen Anstieg der Phosphorylierung am PTEN-Protein im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf ein annähernd gleiches Niveau. Die Zunahme bewegt sich in einem Bereich vom 1,23 (HRG/Pertuz) – 1,33-fachen (Pertuzumab alleine). Somit ist bis auf die starke Zunahme der Phosphorylierung bei der Kombination EGF mit Pertuzumab kein bestimmtes Muster erkennbar.

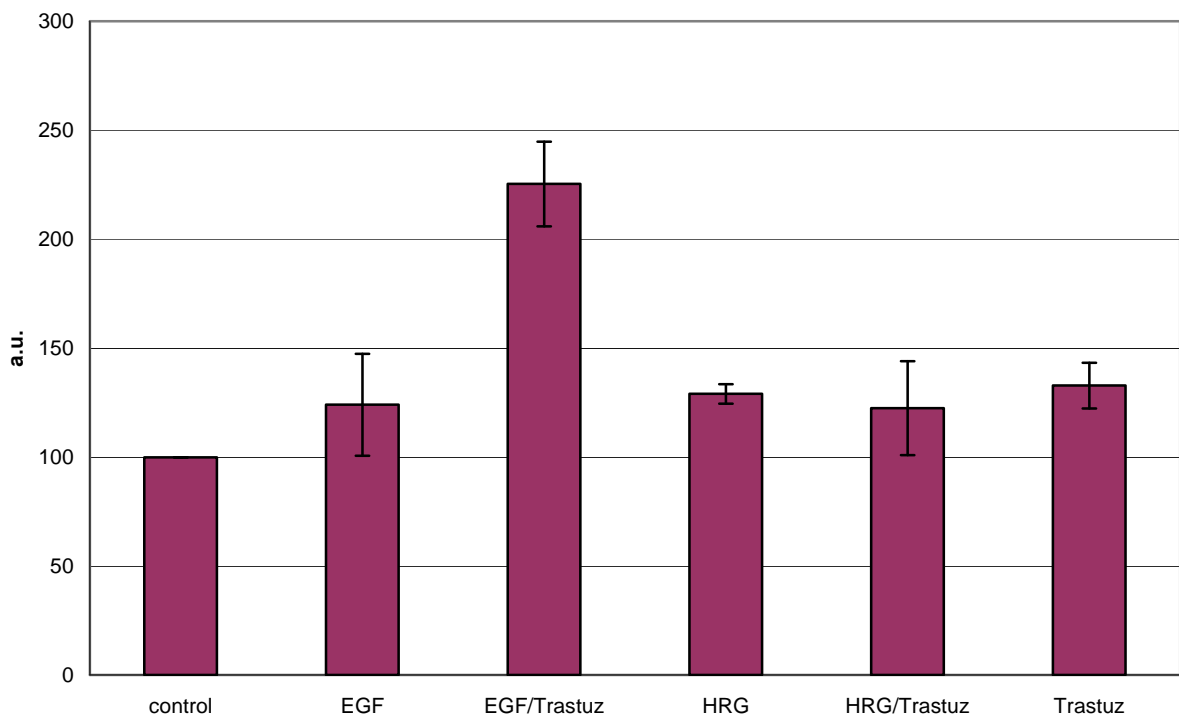


Abb. 15) Der Phosphorylierungsgrad des PTEN-Proteins bei SK-BR-3 an den drei Phosphorylierungsstellen Ser380, Thr282 und Thr283. Dargestellt ist die unstimulierte Kontrolle, sowie die Behandlungsmodi EGF; EGF/Trastuz, HRG; HRG/Trastuz und Trastuz ohne weiteren Stimulationspartner.

3.4.4. DIE PTEN-PHOSPHORYLIERUNG AM SER380, THR282 UND THR283 NACH STIMULATION MIT DEM ANTIKÖRPER PERTUZUMAB BEI SK-BR-3

In Analogie zur Voruntersuchung (s. Kap. 3.4.3.) führt die Stimulation mit EGF bei SK-BR-3 zu einer leichten Zunahme der Phosphorylierung des PTEN-Proteins um das 1,11-fache (s. Abb. 16). Die Kombination der Stimuli EGF mit dem Antikörper Pertuzumab bewirken eine leichte Zunahme der Phosphorylierung auf ca. 2% über das Ausgangsniveau der unstimulierten Kontrolle. Wurde mit dem synthetischen erbB2-Liganden Heregulin vorbehandelt, sinkt die Phosphorylierung des PTEN-Proteins auf 89% des Ausgangswertes ab. Die Kombination Heregulin und Pertuzumab bewirkt eine starke Zunahme des Phosphorylierungsgrades des PTEN-Proteins um das 1,46-fache. Einen noch stärkeren Effekt konnte mit dem Antikörper Pertuzumab allein erzielt werden, hier wurde die Phosphorylierung um das 1,73-fache gesteigert. Zusammenfassend lassen sich bei allen Messungen keine spezifischen Stimuli identifizieren, die den Phosphorylierungsgrad des PTEN-Proteins immer in eine Richtung treiben. Insbesondere konnte keine Abnahme der Phosphorylierung durch Antikörperzugabe erzielt werden, sondern es erfolgte im Gegenteil überwiegend eine Zunahme.

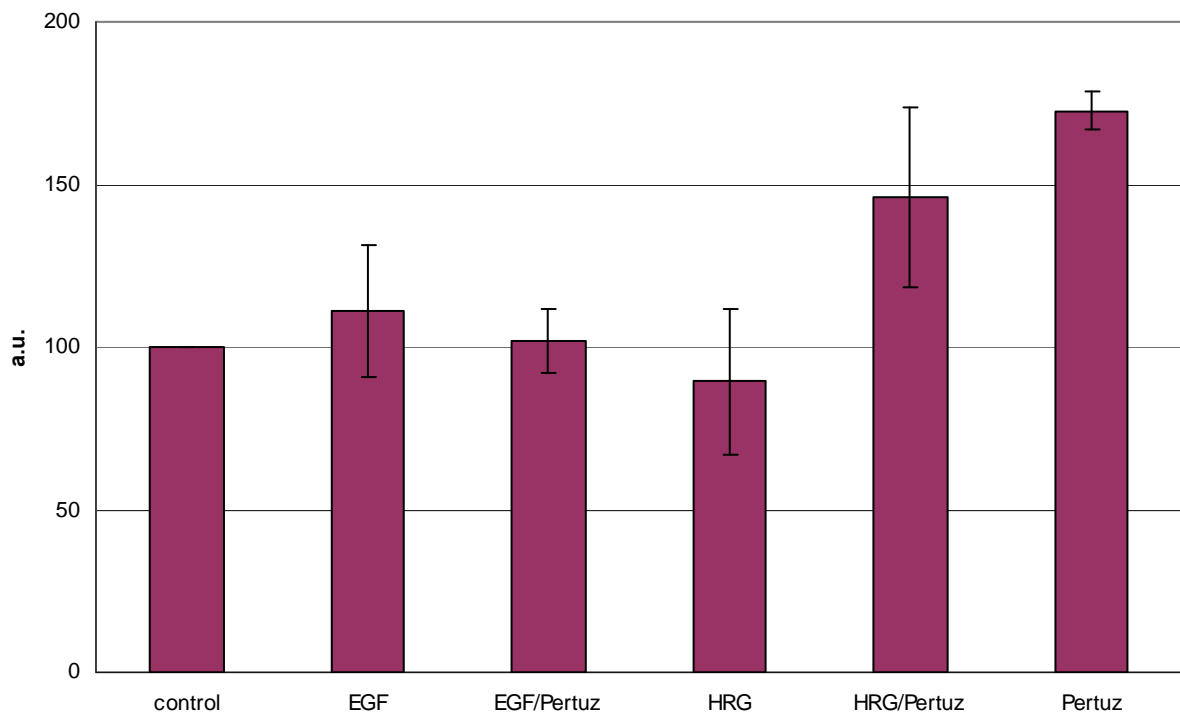


Abb. 16) Der Phosphorylierungsgrad des PTEN-Proteins bei SK-BR-3 an den drei Phosphorylierungsstellen Ser380, Thr282 und Thr283. Dargestellt ist die unstimulierte Kontrolle, sowie die Behandlungsmodi EGF; EGF/Pertuz, HRG; HRG/Pertuz und Pertuz ohne weiteren Stimulationspartner.

4. DISKUSSION

Der erbB2-Rezeptor hat durch die Zulassung des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab im Jahre 1998 zur Behandlung des erbB2-überexprimierenden metastasierten Mammakarzinoms erheblich für die Diagnostik, Prognose und als therapeutischer Angriffspunkt an Bedeutung gewonnen. Somit wurde das übliche therapeutische Spektrum aus Chirurgie, Zytostase, Radiatio und Hormonbehandlung ergänzt. Nach drei bedeutenden Studien (B-31, N9831, HERA) erfolgte schließlich die Zulassung für die adjuvante Therapie des erbB2-überexprimierenden Mammakarzinoms im Jahre 2006 (s. Kap. 1.2.5.). Da nur ca. 20 – 25 % der Mammatumoren eine Genamplifikation mit konsekutiver Überexpression des erbB2-Rezeptors aufweisen, erfolgte die Entwicklung anderer therapeutischer Antikörper, die auch bei Tumoren wirken sollen, die keine Überexpression des erbB2-Rezeptors zeigen. Aus der Vielzahl neuer Medikamente (s. Tab. 1) versprach ein Antikörper, Pertuzumab, dieses Ziel zu erfüllen. Durch seinen anderen Angriffspunkt (s. Abb. 3) und seine spezielle Wirkungsweise, die Hetero- und Homodimerisierung der einzelnen erbB-Rezeptorenmonomere untereinander zu verhindern (s. Kap. 1.2.5.), kann er theoretisch auch bei einem Tumor mit normalem erbB2-Expressionslevel eingesetzt werden. Diese beiden therapeutischen Antikörper wurden für die Untersuchungen ausgewählt, mit dem Ziel, mögliche Unterschiede hinsichtlich der von ihnen induzierten molekularen Mechanismen zu identifizieren und die jeweilige Effizienz der Inhibition einer Tumorzellproliferation zu bestimmen.

4.1. DIE PHOSPHORYLIERUNG DES ERBB2-REZEPTORS NACH BEHANDLUNG VON BT474 UND SK-BR-3 MIT TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB

Anhand der Untersuchungen aus einer vorhergehenden Arbeit [39] konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an den Tyrosinresten bei BT474, als auch bei SK-BR-3 durch die Kurzzeitbehandlung mit Trastuzumab verstärkt wird. Einen Ähnlichen Effekt, kann man beobachten, wenn ein erbB2-Rezeptormonomer mit einem anderen Monomer aus der erbB-Rezeptorfamilie dimerisiert, oder mit einem homologen erbB2-Monomer homodimerisiert (s. Kap. 1.2.2. u. 1.2.3.). Grundsätzlich assoziiert man mit einer Induktion der Rezeptorphosphorylierung die Vermittlung eines mitogenen Signals (z. B. über den MAPK oder den PI3K-Akt-Signalweg ins Zellinnere. In dieser Arbeit (und anderen Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe) konnte hingegen gezeigt werden, dass trotz der durch Antikörperbehandlung induzierten Rezeptorphosphorylierung ein proliferationsinhibitorischer Effekt vermittelt wird, was

bedeutet, dass eine Phosphorylierung an den Tyrosinresten des erbB2-Rezeptors nicht zwangsweise mit einer Induktion eines proliferativen / mitogenen Reizes einhergeht. (Aus diesem Grunde erscheint es sinnvoller, von einer Rezeptorphosphorylierung anstatt von einer Rezeptoraktivierung zu sprechen, um fehlgeleitete Assoziationen zu vermeiden.) Eine postulierte Erklärung für diesen Sachverhalt ist in der Literatur zu finden. Demnach soll die agonistische Wirkung des Trastuzumabs auf den erbB2-Rezeptor mit einem *Downstream-Effekt* auf die PI3K in Verbindung gebracht werden [50,51]. Ein weiterer, fundamentaler Wirkmechanismus des Antikörpers Trastuzumab stellt die *Downregulation* des erbB-2-Rezeptors dar [52]. Die Verringerung der Anzahl der für die Signaltransduktion zur Verfügung stehenden erbB2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird als grundlegender Mechanismus für die inhibitorische Wirkung des Antikörpers angesehen [53]. Derzeit ist der Zusammenhang zwischen der agonistischen Wirkung des Trastuzumabs auf die Autophosphorylierung der Tyrosinreste und der Downregulation des erbB2-Rezeptors noch nicht geklärt. Der ErbB2-Rezeptor besitzt 19 verschiedene Phosphorylierungsstellen [22]. Die Summe der Änderungen des Phosphorylierungsgrades an den einzelnen Tyrosinresten des Rezeptors bildet die Ebene der Gesamtphosphorylierung. Dadurch wurde es notwendig, die Korrelation von Ligandenstimulierung mit der spezifischen Phosphorylierung am erbB2-Rezeptor zu untersuchen. Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit für BT474 und SK-BR-3 der Wachstumsfaktor- und Pertuzumab-abhängige Phosphorylierungsstatus der Tyrosine 877 und 1248 analysiert. Zum Antikörper Trastuzumab lagen für die beiden Tyrosine bereits aus einer vorhergehenden Arbeit [39] Daten zu den beiden Tyrosinen vor. Beide Datensätze werden im Folgenden miteinander verglichen.

4.1.1. DIE SPEZIFISCHE PHOSPHORYLIERUNG DES ERBB2-REZEPTORS AM TYROSIN 877 NACH BEHANDLUNG MIT TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB

Bei BT474 und SK-BR-3 induziert die Behandlung mit Pertuzumab unabhängig von einer gleichzeitigen Applikation der Wachstumsfaktoren EGF und HRG eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung des Tyrosin 877 (s. Abb. 7). Beim Antikörper Trastuzumab ergibt sich ein nahezu identisches Bild, trotz der unterschiedlichen Bindungsstelle an Domäne II des erbB2-Rezeptors [39]. Die stärkste Zunahme der Phosphorylierung bewirkt jeweils die Kombination EGF/Pertuzumab und EGF/Trastuzumab. Somit lässt sich bei beiden Antikörpern eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung des Tyrosin 877 als Antwort der Zelle auf die Bindung der Antikörper an die extrazelluläre Domäne des erbB2-Rezeptors erzielen. Bei der Zelllinie

SK-BR-3 ist die Zunahme der Phosphorylierung nach Behandlung mit dem Antikörper Trastuzumab deutlicher stärker ausgeprägt als bei BT474. Umgekehrt verhält es sich beim Antikörper Pertuzumab, hier reagiert die Zelllinie BT474 mit einer stärkeren Phosphorylierung als SK-BR-3. Im Unterschied zu BT474 wird bei SK-BR-3 durch EGF eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung am Tyrosin 877 ausgelöst. Somit ähneln sich die durch EGF und den beiden therapeutischen Antikörpern bewirkten Mechanismen, die bei SK-BR-3 eine Inhibition der Proliferation bewirken.

Zusammenfassend kristallisiert sich heraus, dass die Phosphorylierung am Tyrosin 877 eine wichtige Bedeutung für die antiproliferative Wirkung der beiden Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab auf die beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 besitzt.

4.1.2. DIE BIOLOGISCHE FUNKTION DES TYROSIN 877 DES ERBB2-REZEPTORS

Früher wurde angenommen, dass die Phosphorylierungsstelle 877 eine Autophosphorylierungsstelle ist. *Xu et al.* [54] konnten zeigen, dass das Tyrosin 877 durch die Src-Kinase phosphoryliert wird. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass die Phosphorylierung am Tyrosin 877 für die generelle Kinaseaktivität des erbB2-Rezeptors eine große Rolle spielt. Bei einer Mutation des erbB2-Rezeptors, an der das Tyrosin 877 fehlt, kann man feststellen, dass das Potential zur Phosphorylierung des erbB2-Rezeptors generell herabgesetzt ist. (Dies gilt auch für das Tyrosin 1248; vgl. 4.1.3). Durch Experimente zeichnet sich eine direkte Beziehung zwischen der Phosphorylierung am Tyrosin 877 und 1248 ab. Bei steigender Phosphorylierung des Tyrosin 877 nimmt auch die Phosphorylierung des Tyrosin 1248 zu, bei Elimination des Tyrosin 877 durch Mutation findet sich kaum eine Phosphorylierung am Tyrosin 1248 [54]. Somit ist die Phosphorylierung am Tyrosin 877 Ausdruck einer generellen Aktivierung des erbB2-Rezeptors, welche durch die Src-Kinase vermittelt wird. Einen Versuch, den Mechanismus zur Aktivierung des erbB2-Rezeptors nach Phosphorylierung des Tyrosins 877 zu deuten, führten *Xu et al.* mittels Computermodellen zur Molekülgeometrie des erbB2 durch. Demnach soll bei unphosphoryliertem Tyrosin 877 die A-Schleife des erbB2 von einer ATP-Bindungsstelle eine modifizierte Konformation annehmen, wodurch eine Phosphorylierung mittels ATP verhindert wird. Durch die Tyr-877-Phosphorylierung kann nach dem Modell die Phosphatgruppe starke Salzbrücken mit zwei Argininresten etablieren, die eine Konformationsänderung der A-Schleife induzieren. Diese Konformationsänderung soll durch die Freigabe einer Bindungsstelle für ATP zur aktiven Konformation des Rezeptors führen [54].

4.1.3. DIE SPEZIFISCHE PHOSPHORYLIERUNG DES ERBB2-REZEPTORS AM TYROSIN 1248 NACH BEHANDLUNG MIT TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB

Bei der Stimulation der beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 mit dem Antikörper Pertuzumab lässt sich, unabhängig von der Zugabe von Wachstumsfaktoren, eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung am Tyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors feststellen, wobei die Phosphorylierung bei BT474 deutlich stärker ausfällt als bei SK-BR-3 (vgl. Abb. 8). Ähnlich wie beim Tyrosin 877 zeigt die Stimulation mit Trastuzumab eine deutlich stärkere Zunahme der Phosphorylierung am Tyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors bei der Tumorzelllinie SK-BR-3. Bei BT474 ist der Effekt geringer, aber unabhängig von der Zugabe von Wachstumsfaktoren. Auffällig erscheint die Tatsache, dass bei SK-BR-3 die größte Zunahme der Phosphorylierung durch alleinige Behandlung mit Trastuzumab eintritt. Die Zugabe von EGF oder HRG zum Trastuzumab bewirkt bei SK-BR-3 eine Erniedrigung des Phosphorylierungsgrades des Tyrosin 1248 [39]. Auch hier zeigt sich bei beiden Datensätzen eine Zunahme der Phosphorylierung des Tyrosin 1248 bei der Zelllinie SK-BR-3 nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF.

Ähnlich wie beim Tyrosin 877 spielt der Phosphorylierungsgrad des Tyrosin 1248 für die antiproliferative Wirkung der beiden therapeutischen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab, sowie der Wachstumsfaktor EGF bei SK-BR-3, eine wesentliche Rolle. Eine Zunahme der Phosphorylierung an dieser Stelle ist mit einer Inhibition der Proliferation verbunden.

4.1.4. DIE BIOLOGISCHE FUNKTION DES TYROSIN 1248 DES ERBB2-REZEPTORS UND DIE WIRKUNGSWEISE DER CSK HOMOLOGOUS KINASE (CHK)

Das Tyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors wird im Allgemeinen als die wichtigste Schlüsselstelle für die Vermittlung eines proliferativen Reizes angesehen, da diese Phosphorylierungsstelle über das Shc-Adaptorprotein eine indirekte Verbindung des Rezeptors zum fundamentalen mitogenen PI3K-Akt-Weg herstellt (vgl. Kap. 1.2.3.) [55;10]. Daher stellt sich die Frage, warum die beiden antiproliferativ wirkenden Antikörper Pertuzumab und Trastuzumab gerade am Tyrosin 1248 eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung bewirken. Einen wichtigen Baustein zur Beantwortung dieser Frage liefert *Soyoun Kim et al.* mit den Untersuchungen zum CHK-Protein. Das CHK-Protein besitzt zwei so genannte SH2-Domänen, Typ I und II. Der Typ I kann Proteine, wie Src-Kinase, Lck, Fyn und Abl binden, der Typ II kann mit dem phosphorylierten Tyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors interagieren. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass

die positive Ladung des Arg¹⁴⁷ eine fundamentale Bedeutung für die Bindung des CHK-Proteins mit seiner SH2-Domäne an das negativ geladene Phosphotyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors besitzt. Es konnte nachgewiesen werden, dass das CHK-Protein die Aktivität der Src-Kinase, die für eine Steigerung des mitogenen Reizes des erbB2-Rezeptors auf die Zelle notwendig ist, herunterreguliert. In vitro ist die Phosphorylierung von Tyrosinresten am C-Terminus von Src-Protein-assoziierten Proteinen durch die CHK beschrieben, was als Wirkungsmechanismus angenommen werden kann [56]. Somit stellt die Phosphorylierung des Tyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors eine grundlegende Voraussetzung für die Bindung der CHK dar, welche zur Entfaltung der antiproliferativen Wirkung der CHK durch Downregulation der Src-Kinase notwendig ist, ein Mechanismus, der im hier untersuchten System verantwortlich sein könnte.

4.1.5. ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG DES WIRKUNGSMECHANISMUS DER BEIDEN ANTIKÖRPER TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB AUF DIE PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN DES ERBB2-REZEPTORS

Nach Stimulation mit den beiden Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab zeigte sich eine generelle Zunahme der Phosphorylierung an den Tyrosinen 877 und 1248. Ein möglicher Wirkmechanismus kann im Folgenden dargestellt werden. Die Bindung der therapeutischen Antikörper bewirkt am Tyrosin 877 des erbB2-Rezeptors eine Phosphorylierung, die durch die Src-Kinase bewerkstelligt wird. Dies führt zu einer generellen Zunahme der Aktivität des erbB2-Rezeptors (s. Kap. 4.1.2.), wodurch die Voraussetzung für die Phosphorylierung der anderen Tyrosine, insbesondere des Tyrosins 1248 geschaffen wird. Das Tyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors, das nach Antikörperbindung ebenfalls phosphoryliert wird, kann sowohl einen mitogenen Reiz ans Zellinnere über den PI3K-Akt-Weg weiterleiten, als auch über das CHK-Protein zu einer Inhibition der Src-Kinase führen (s. Kap. 4.1.4.). Dies hat eine Downregulation der Rezeptoraktivität zur Folge. Ferner trägt die Inaktivierung der Src-Kinase dazu bei, dass das PTEN-Protein, ein wichtiges Tumorsuppressorprotein (s. Kap. 1.3.), nicht inaktiviert wird.

Dadurch kann die Signalweiterleitung über den PI3K-Akt-Signalweg wirkungsvoll herunterregelt werden [28]. Insgesamt betrachtet, überwiegen die antiproliferativen Eigenschaften des Phosphotyrosin 1248 des erbB2-Rezeptors nach Antikörperbindung deutlich über die proliferativen Reize. Somit ist die Phosphorylierung des Tyrosin 1248 auch mit der antiproliferativen Wirkung der beiden therapeutischen Antikörper in Einklang zu bringen. Eine weitere interessante Phosphorylierungsstelle, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, stellt das Tyrosin 1112 des erbB2-Rezeptors dar. Es handelt sich hierbei um eine Bindungsstelle

für die E3 Ubiquitin-Ligase c-Cbl [57], die nach der Internalisierung des Rezeptors dessen lysosomale Degradation vermittelt [58]. Aus einer vorhergehenden Arbeit [39] wurde gezeigt, dass nach Bindung des Antikörpers Trastuzumab die Phosphorylierung an dieser Stelle kaum zunimmt, außer bei der Zelllinie SK-BR-3 nach Zugabe von EGF, welches bei dieser Zelllinie paradoxerweise zur Inhibition der Proliferation führt. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass das Tyrosin 1112 des erbB2-Rezeptors nur eine untergeordnete Rolle bei der Antikörpertherapie spielt, und der antiproliferative Effekt hauptsächlich über das Tyrosin 877 und 1248 vermittelt wird.

Die gesamten Ergebnisse der Untersuchungen an den Phosphorylierungsstellen des erbB2-Rezeptors deuten darauf hin, dass nach Antikörperbindung für die antiproliferativen Wirkungen nicht nur die spezifische Phosphorylierung einzelner Tyrosinreste des Moleküls ausschlaggebend ist, sondern vermutlich eher die Gesamtkonformation bzw. Struktur der potentiell phosphorylierten Rezeptortyrosinreste auf intrazellulärer Seite [59,60,61].

Darüber hinaus dürften auch im Zytoplasma befindliche Moleküle, wie z.B. das CHK-Protein, eine entscheidende Rolle spielen. Obwohl dieser Sachverhalt die molekularen Mechanismen der antiproliferativen Wirkung der onkologischen Antikörpertherapie erheblich kompliziert, so schafft er im Feld der zytoplasmatischen Proteinen auch wiederum potentielle Angriffspunkte für zukünftige Pharmaka oder die Gentherapie. So ist beispielsweise mit dem CHK-Protein ein starker Proliferationshemmer in Mammatumorzellen gefunden worden, der möglicherweise bei antiproliferativen Therapiestrategien mit einbezogen werden kann [56]. Inwieweit das CHK-Protein auch in den hier verwendeten Zellsystemen eine Rolle spielt und für die antiproliferative Wirkung von Bedeutung ist, müsste zukünftig untersucht werden.

4.2. DER ANTIPROLIFERATIVE EFFEKT VON TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB AUF DIE MAMMAKARZINOMZELLINIEN BT474 UND SK-BR-3

Um den antiproliferativen Effekt der beiden Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab darstellen zu können, wurden DNA-Messungen der S-Phase-Fraktion von BT474 und SK-BR-3 durchgeführt. Somit kann die Wirkung der beiden unterschiedlichen Antikörper auf die beiden Tumorzelllinien verglichen werden. Außerdem kann damit die Frage beantwortet werden, ob eine Tumorzelllinie generell stärker auf eine Therapie mit den Antikörpern anspricht.

4.2.1. DER ANTIPROLIFERATIVE EFFEKT VON TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB AUF BT474

Nach Behandlung mit dem Antikörper Pertuzumab zeigt sich eine minimale Verringerung der SPF im Vergleich zum Ausgangswert (s. Abb. 9). Der gleiche Level kann auch noch beim späteren Messzeitpunkt festgestellt werden. Daraus lässt sich erkennen, dass eine Stimulation mit Pertuzumab bei BT474 kaum einen antiproliferativen Effekt hat. Beim Antikörper Trastuzumab finden sich ebenso beim frühen und späten Messzeitpunkt die nahezu gleichen Werte, allerdings ist die SPF auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes geschrumpft. Somit kann festgehalten werden, dass die Behandlung mit Trastuzumab der Behandlung mit Pertuzumab bei BT474 deutlich überlegen ist. Interessant ist die Kombination von Pertuzumab und Trastuzumab. Hier lässt sich bei BT474 beim späten Messzeitpunkt eine Abnahme der SPF auf ein Viertel des Ausgangswertes verzeichnen. Somit ist es nahe liegend, dass bei der Kombination der beiden Antikörper synergistische Effekte auftreten.

Zusätzlich wurden Zellen mit dem Wachstumsfaktor EGF stimuliert. Erwartungsgemäß stieg die SPF beim ersten Messzeitpunkt auf über das Doppelte an. Allerdings hält der Effekt von EGF auf diese Zelllinie nicht lange an, denn am zweiten Messzeitpunkt ist die SPF identisch mit den unstimulierten Zellen.

4.2.2. DER ANTIPROLIFERATIVE EFFEKT VON TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB AUF SK-BR-3

Ähnlich wie bei BT474 erzielt die Stimulation mit dem Antikörper Pertuzumab bei SK-BR-3 keine nennenswerte Inhibition der Proliferation (s. Abb. 10). Bei der Behandlung mit dem Antikörper Trastuzumab zeigt sich eine moderate Abnahme der SPF zu beiden Messpunktzeiten. Auch hier ist der Antikörper Trastuzumab dem Antikörper Pertuzumab deutlich überlegen. Die Kombination der beiden therapeutischen Antikörper vermittelt einen kaum größeren antiproliferativen Effekt auf die Zellproliferation als der Einsatz von Trastuzumab ohne Kombinationspartner. Insgesamt sind die antiproliferativen Effekte bei SK-BR-3 deutlich geringer ausgeprägt als bei BT474.

Auffällig ist bei SK-BR-3, dass der scheinbar größte antiproliferative Effekt durch den Wachstumsfaktor EGF vermittelt wird, von dem man generell einen proliferationsstimulierenden Effekt erwartet. (Das hier keine Artefaktmessung vorliegt, konnte bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden (Heiss et al. 2001, Diermeier et al. 2005). Beim zweiten

Messzeitpunkt befinden sich nur noch ein Viertel der Zellen in der S-Phase, was erkennen lässt dass der antiproliferative Effekt nachhaltig und der Kombination der beiden Antikörper deutlich überlegen ist. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen an den Phosphorylierungsstellen (s.Kap 4.1). Dort erzielte man mit der Stimulation mit EGF bei SK-BR-3 ähnliche Veränderungen wie nach Behandlung mit den therapeutischen Antikörpern.

4.2.3. ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG DES ANTIPROLIFERATIVEN EFFEKTS DER ANTIKÖRPER TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB AUF DIE MAMMAKARZINOMZELLINIEN BT474 UND SK-BR-3

Zusammenfassend betrachtet ist der Antikörper Trastuzumab dem Antikörper Pertuzumab in der Monostimulation deutlich überlegen. Einen größeren antiproliferativen Effekt auf beide Zelllinien bewirkt die Kombination der beiden therapeutischen Antikörper. Daraus lässt sich ableiten, dass ein synergistischer Effekt zwischen den beiden Antikörpern besteht. Beide verfügen offensichtlich über eine unterschiedliche, molekulare Wirkungsweise. Pertuzumab bindet an die Domäne II des erbB2-Rezeptors und inhibiert insbesondere die Heterodimerisierung der erbB-Rezeptor-monomeren untereinander. Trastuzumab bindet an die Domäne IV des erbB2-Rezeptors, stabilisiert dessen Homodimerisierung [39] und bewirkt dessen Downregulation (s. Kap. 1.2.5.). Der unterschiedliche Angriffspunkt der beiden Antikörper dürfte demnach für die unterschiedlichen, nachgeschalteten molekularen Wirkmechanismen verantwortlich sein.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie SK-BR-3 deutlich resistenter auf die Antikörperzugabe reagiert als BT474.

Die Regulation der Proliferation bei SK-BR-3 weist im Gegensatz zu BT474 die Besonderheit auf, dass EGF eine starke, aber transiente, inhibitorische Wirkung auf die Zelllinien entfaltet, ein Prozess, der bis dato noch nicht verstanden wurde.

4.3. DER UNTERSCHIEDLICHE PTEN-GEHALT DER BEIDEN ZELLINIEN BT474 UND SK-BR-3

Auf die Frage, warum die beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 ein unterschiedliches Ansprechen auf die Antikörpertherapie aufweisen, ergaben sich frühzeitig Hinweise, dass nicht allein die Expression des ErbB2-Rezeptors und die Koexpression der anderen Familienmitglieder der Rezeptortyrosinkinasen wichtig sind, sondern auch andere, insbesondere

sich im Inneren der Zelle abspielende Prozesse eine große Bedeutung aufweisen. Es wurde daher das seit den 90er Jahren intensiv erforschte PTEN-Protein für das Ansprechen einer Therapie mit Trastuzumab verantwortlich gemacht. Wie in Kap. 1.3. ausgeführt, wurde die These aufgeworfen, dass bei Zelllinien mit niedrigem oder nicht physiologisch arbeitendem PTEN-Protein der PI3K-Weg nicht effizient unterdrückt werden kann und somit unabhängig von der Bindung eines therapeutischen Antikörpers an den ErbB2-Rezeptor ein mitogenes Signal ins Zellinnere weitergeleitet wird. Auch in meinen Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass die Zelllinie BT474, deren Proliferationsrate deutlich besser durch die Behandlung mit den Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab abgesenkt werden konnte, eine doppelte Menge an PTEN-Protein besitzt (s. Kap 3.3.), was die oben beschriebene These stützt.

4.3.1. DIE REGULATION DER TRANSKRIPTION DES PTEN-GENS

Auf die Frage warum die unterschiedlichen Zelllinien einen deutlich weit auseinander liegenden PTEN-Gehalt aufweisen, gibt es derzeit noch keine befriedigende Antwort. Zum einen kann das PTEN-Gen durch Mutation geschädigt sein und dies zu einer zahlenmäßigen Unterexpression führen und zum Anderen kann durch eine unkorrekte Proteinsequenz die biologische Funktion des Proteins beeinträchtigt sein. Der letztere Sachverhalt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft. In der Literatur lassen sich einige Hinweise zur Regulation der PTEN-Expression finden, die letztendlich bei den unterschiedlichen PTEN-Gehalten der Zelllinien eine große Rolle spielen.

Früher wurde angenommen, dass das PTEN-Protein konstitutiv exprimiert wird. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es einige Transkriptionsfaktoren gibt, die an die Promotorregion des PTEN-Gens binden und an der Regulation der PTEN-Expression teilnehmen. *Virolle et al.* konnten nachweisen, dass PTEN nach Strahlenbehandlung von Zelllinien durch EGR1 hochreguliert wird. Ähnliche Ergebnisse konnten mit IGF2 erbracht werden. Es konnte letztendlich nachgewiesen werden, dass in Zellen von nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen der EGR1-Spiegel streng mit der PTEN-Expression korreliert (*Ferraro et al., 2005*). Ein weiterer interessanter Regulationsmechanismus scheint durch die Aktivierung des *peroxisome proliferator activated receptor γ* (PPAR γ) vermittelt zu werden. Wird der Rezeptor durch Rosiglitazon, ein weit verbreitetes Medikament in der Diabetesbehandlung, aktiviert, bindet dieser an den PTEN-Promotor an zwei Stellen und es erfolgt die Hochregulation der PTEN-Expression in normalen und in Tumorzellen (*Patel et al.*). Diese Beobachtung hat Wissenschaftler animiert, weitere Untersuchungen in Bezug auf den zu erwartenden Benefit

einer Behandlung von Tumorzellen durch Rosiglitazon durchzuführen. Entsprechende Studien sind derzeit noch nicht abgeschlossen. Ein weiteres sehr wichtiges Tumorsuppressorprotein stellt p53 dar. Auch dieses Protein kann an die Promotorregion binden und die PTEN-Transkription erhöhen (*Stambolic et al.*). Es scheint sogar eine komplexe Verbindung zwischen PTEN und p53 zu existieren. Beispielsweise konnte an knock-out-Mäusen nachgewiesen werden, dass das PTEN-Protein essentiell für die p53-assoziierte Apoptose von Mauszellen ist. Dadurch wird noch einmal die gewichtige Rolle des PTEN-Proteins in der Tumorbilogie unterstrichen.

Es konnten auch einige wichtige Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die zu einer negativen Regulation des PTEN-Proteins beitragen. *Mitogen-activated protein kinase kinase-4* (MKK4) inhibiert die PTEN-Transkription durch Aktivierung von NF κ B, das ebenfalls an die Promotorregion binden kann (*Xia et al.*). *Transforming growth factor β* (TGF β) verringert ebenfalls die PTEN-Menge in der Zelle (*Chow et al.*). [62]

All diese zum Teil sehr komplexen Mechanismen tragen in normalen und in Tumorzellen dazu bei, die PTEN-Expression zu regeln. Jeder dieser Transkriptionsfaktoren, insbesondere p53, können in der Tumorzelle durch Mutation in ihrer biologischen Funktion betroffen sein. Es wird zukünftig ein großer Aufwand betrieben werden müssen, um weitere Faktoren zu identifizieren und neue Angriffspunkte für zukünftige Pharmaka zu schaffen. Wichtig ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt, dass die Menge des PTEN-Proteins in der Zelle möglicherweise einen prädikativen Wert in Bezug auf die Trastuzumab-Therapie besitzt. Daher könnte es eine sinnvolle Maßnahme darstellen, ein biochemisches Diagnostiksystem zu entwickeln, mit der das Ansprechen auf eine derartige Therapie vorausgesagt werden kann. Ein ähnliches System existiert bereits beim Antikörper Cetuximab, der nur bei einem k-ras-Wildtyp effektiv eingesetzt werden kann, den übrigen Patienten können die bei diesem Antikörper grundsätzlich auftretenden lästigen Hauterscheinungen erspart werden. Insofern ebnen diese Ergebnisse den Weg zur individuelleren Krebstherapie mit target-spezifischen Pharmaka.

4.4. DIE PHOSPHORYLIERUNG DES PTEN-PROTEINS

4.4.1. DIE UNTERSUCHUNGEN AN DEN PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN SER380, THR382 UND THR383

Das PTEN-Protein besteht aus einem N-Terminus, einer lipidbindenden C2-Domäne und einem aus 50 Aminosäuren bestehenden C-Terminus, der als „Schwanz“ bezeichnet wird. Auf diesem Schwanz befinden sich die Phosphorylierungsstellen des Proteins, unter anderem die in dieser

Arbeit untersuchten Stellen Ser380, Thr382 und Thr383. Im Kapitel 1.3. wurde erörtert, dass das PTEN-Protein theoretisch im phosphoryliertem Zustand inaktiv ist, und der PI3K-Weg ungehindert ablaufen kann.

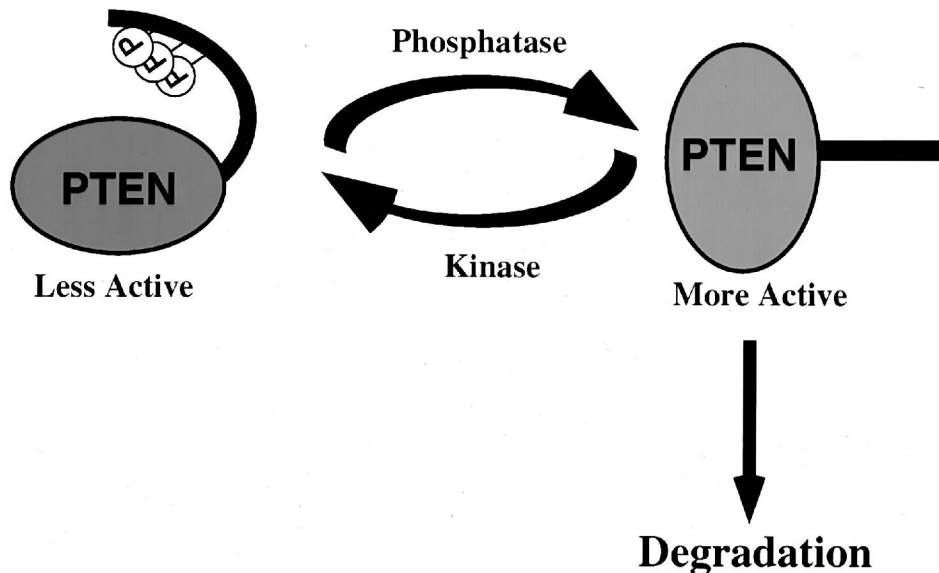


Abb. 17) Modell von *Vasquez et al.* zur Regulation des PTEN-Proteins durch die Phosphorylierung des Schwanzbereiches. Der Anhang des PTEN-Symbols repräsentiert den Proteinschwanz mit den entsprechenden Phosphorylierungsstellen. Eine Phosphorylierung wird durch den eingekreisten Buchstaben P verdeutlicht. Nach diesem Modell bewirkt eine Phosphorylierung eine Abnahme der Aktivität des PTEN-Proteins. Im Gegensatz dazu gewinnt das PTEN-Protein an biologischer Aktivität durch eine Dephosphorylierung, wobei jedoch die Degradation des PTEN zunimmt [35].

Allerdings befinden sich noch weitere als die drei untersuchten Phosphorylierungsstellen auf dem Proteinschwanz. Die Entscheidung für diese drei Stellen wurde durch das Angebot entsprechender Antikörper aus der Industrie wesentlich mitbestimmt, für die anderen Stellen waren zum Zeitpunkt kaum sinnvoll zu gebrauchende Antikörper auf dem Markt. Weiterhin wurde die Wichtigkeit dieser drei Stellen für die Funktion und Stabilität von PTEN in der Literatur betont (*Vasquez et al.*) [34].

So wurde laut der oben beschriebenen Theorie angenommen, dass die Phosphorylierung des PTEN-Proteins durch Stimulation der Zellen mit EGF ansteigt. In der Tat konnten in allen vier Versuchsschienen ein leichter Anstieg der Phosphorylierung der drei Stellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erzielt werden. Der Anstieg fiel bei BT474 etwas deutlicher aus, als bei SK-BR-3 (s. Kap. 3.4.1. bis 3.4.4.). Ein ähnlicher Sachverhalt sollte sich theoretisch auch bei dem synthetischen ErbB2-Liganden Heregulin einstellen. Bei BT474 konnten in drei Versuchsreihen jeweils ein kaum signifikanter Anstieg (s. Kap. 3.4.1.) und in den anderen drei Versuchen (s. Kap. 3.4.2.) jedoch ein kräftiger Anstieg unter den gleichen Versuchsbedingungen

erzielt werden. Bei SK-BR-3 stellten sich widersprüchliche Ergebnisse ein, in einer Versuchsreihe kam es zu einem leichten Abfall (s. Kap. 3.4.4.) und in der anderen zu einem leichten Anstieg der Phosphorylierung des PTEN-Proteins (s. Kap. 3.4.3.). Somit lieferten die Untersuchungen an den drei Phosphorylierungsstellen unter Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren keine signifikanten Daten, die die Theorie derzeit stützen könnten.

Die beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 wurden jeweils mit den beiden therapeutischen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab behandelt und die Phosphorylierung an den drei oben erwähnten Phosphorylierungsstellen des PTEN-Proteins gemessen. Leider konnte hier an allen vier Versuchslinien (s. Kap. 3.4.1. – 3.4.4.) keine einheitliche Reaktionstendenz festgestellt werden. Theoretisch wäre eine Abnahme der Phosphorylierung zu beobachten, in den hier unternommenen Versuchen war, auch nach mehreren Anläufen, dieser Trend nicht zu beobachten. Im Gegenteil, in den allermeisten Fällen trat eine Zunahme der Phosphorylierung auf. Die Zusammenschau der erhobenen Daten zeigt, dass die Regulation des PTEN-Proteins in Tumorzellen ein wesentlich komplexerer Vorgang ist, bei dem Phosphorylierungen nur einen Teil der komplizierten Mechanismen darstellen. Im Folgenden sollen weitere Aspekte der Phosphorylierung des PTEN-Proteins diskutiert werden.

4.4.2. DIE BIOLOGISCHE FUNKTION DER PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN SER380, THR382 UND THR383

Experimentell konnte vorgeführt werden, dass das PTEN-Molekül auch ohne den gesamten Schwanzbereich inklusive seiner Phosphorylierungsstellen aktiv ist und somit den PI3K-Weg wirkungsvoll inhibieren kann. Überraschenderweise war die Aktivität einer Mutante des PTEN ohne Schwanzbereich höher als diejenige des Wildtyps [35]. Somit war klar, dass die Phosphorylierungsstellen nicht allein für die biologische Aktivität verantwortlich sein können. *Vasquez et al.* konnten auch zeigen, dass die unphosphorylierte Form des PTEN-Proteins den PI3K-Weg wirkungsvoller inhibiert, jedoch deutlich instabiler ist und somit eine kürzere Halbwertszeit besitzt. Als möglicher Mechanismus wurde eine Ubiquitinierung und eine anschließende Degradation im Proteasom postuliert. Aus den Untersuchungen ging ferner hervor, dass die Mehrzahl der PTEN-Moleküle in der Zelle phosphoryliert sind und sich somit in einem wenig aktiven, jedoch stabilen Zustand befinden [35] (S. Abb. 17). Diese Befunde werfen jedoch die Frage auf, mit welchem Mechanismus die Phosphorylierung und somit die Abnahme der Aktivität des PTEN verbunden sind. Dazu ist eine nochmalige Betrachtung des genauen Aufbaus des PTEN-Proteins und dessen mögliche Interaktionspartner notwendig.

4.4.3. DIE PHOSPHORYLIERUNG DES PTEN ALS MODIFIKATION DER BINDUNGS-AFFINITÄT DES PTEN FÜR MOLEKÜLE AN DER ZELLMEMBRAN

Das PTEN-Protein kann generell in zwei funktionelle Einheiten geteilt werden. In der aminoterminalen Hälfte sitzen die Phosphatase-Domänen, die die entsprechenden Substrate dephosphorylieren können (z.B. Phosphatidylinositol-3-kinase). Die carboxyterminale Hälfte besitzt drei Unterdomänen. Zum einen eine C2-Domäne, welche an Phospholipide und intrazelluläre Vesikel binden kann und zum anderen eine PDZ-bindende Domäne, die die entsprechenden PDZ-Domänen mehrerer anderer Moleküle binden kann, welche im Anschluss noch genauer erläutert werden. Weiterhin befinden sich zwei PEST-Domänen, die mit der Stabilisierung des Moleküls in Verbindung gebracht werden.

Drei separate Forschungsgruppen konnten mehrere Mitglieder der MAGUK-Proteinfamilie als Bindungspartner des PTEN identifizieren. Es handelt sich um das Protein hMAST205, den Proteinkomplex ARIP1/AIP1/MAGI-2 (im Folgendem als MAGI-2 bezeichnet) und das Protein MAGI-3. All diesen Molekülen ist gemeinsam, dass sie fünf bis sechs PDZ-Domänen besitzen, die vom PTEN-Protein mit seiner PDZ-Bindungsdomäne gebunden werden können. Die Proteine der MAGUK-Familie befinden sich an den Zell-Zell-Verbindungen (*Tolkacheva et al.*) [63].

Durch entsprechende Untersuchungen mit PTEN-Proteinen, deren Schwanz durch Mutation verändert worden war, konnte dargestellt werden, dass die dephosphorylierte Zustandsform des PTEN eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zu MAGI-2 aufwies und auch eine deutlich größere biologische Aktivität. Dies impliziert die überaus große Bedeutung der Proteinbindung des PTENs für seine Fähigkeit, den PI3K-Weg wirkungsvoll zu unterdrücken. Als Mechanismus zur Erklärung des veränderten Bindungsverhaltens des PTEN-Proteins für MAGI-2 stellten *Vasquez et al.* eine Konformationsänderung des PTEN nach Phosphorylierung dar. Nach diesem Modell bewirkt die Phosphorylierung, insbesondere der in dieser Arbeit untersuchten drei Phosphorylierungsstellen, eine Konformationsänderung, die die PDZ-Bindungsdomäne für MAGI-2 und die anderen Bindungspartner maskiert [64].

4.4.4. REKRUTIERUNG DER PTEN-MOLEKÜLE AN DIE ZELLMEMBRAN ALS FUNDAMENTALER MECHANISMUS ZUR INHIBITION DES PHOSPHATIDYL-INOSITOL-3-KINASE-WEGES

Neuere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des PTEN-Proteins konnten einige fundamentale Mechanismen zum Verständnis der Funktion des PTEN-Moleküls aufdecken.

Nach diesem Modell befinden sich ca. 95 % der PTEN-Moleküle in phosphoryliertem und somit in einem stabilen Zustand im Zytoplasma. Es herrscht überwiegend biologische Inaktivität. Auf einen noch vollkommen unbekannten Reiz erfolgt die Dephosphorylierung und somit eine Konformationsänderung des PTEN, die die PDZ-Bindungsschleife exponiert. Es findet schließlich die Bindung an ein membranständiges Molekül, das die PDZ-Bindungsdomäne besitzt, wie z.B. MAGI-2, statt. An der Zellmembran bildet sich der sogenannte PTEN-associated complex (PAC), der auch die katalytische p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase mit einbezieht. Es erfolgt noch an der Zellmembran die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-2,4,5-triphosphat und Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat. Somit kann an dieser Stelle der PI3K-Weg wirkungsvoll supprimiert werden. *Vasquez et al.* konnten demonstrieren, dass es sich hier um einen sehr dynamischen Prozess handelt, der pro Molekül zwischen 100 und 400 Millisekunden dauert [65]. Der weitere Weg des PTEN-Proteins ist unklar. Mehrere Möglichkeiten wären denkbar. Da das dephosphorylierte PTEN deutlich instabiler ist als die phosphorylierte Form, ist nach Abdissoziation aus dem PAC eine zügige Degradation, z.B. durch Ubiquitinierung und Abbau im Proteasom, durchaus denkbar. Eine weitere spekulative Variante wäre eine Stabilisierung des PTEN durch Phosphorylierung im Zytoplasma.

4.4.5. DIE BEDEUTUNG DES IM ZELLKERN LOKALISIERTEN PTEN-PROTEINS

Bereits 1996 wurde die Existenz von Phosphatidylinositol-2,4,5-triphosphat und Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat im Zellkern beschrieben. Diese Moleküle haben an der Zellmembran eine große Bedeutung für den PI3K-Weg als mitogener Stimulus in der Zelle. Die Rolle der beiden Moleküle im Zellkern ist bis dato ungeklärt. Auch das PTEN-Protein wurde im Zellkern entdeckt. Es gibt auch Hinweise, dass der Verlust des nukleären PTEN-Proteins mit einer deutlichen Neigung zur Malignität in Zellkulturen einhergeht. Insofern ist von einer gewichtigen Rolle des PTEN im Nukleus in der Regulation der Zellproliferation auszugehen. Es wird derzeit davon ausgegangen, dass PTEN aus dem Zytoplasma passiv durch die Poren des Zellkerns in den Nukleus gelangen kann. Aber es wurden auch nukleäre Lokalisationssequenzen entdeckt, die notwendig für einen Transport durch die Kernmembran mithilfe des *major vault proteine* (MVP) sind. Es gibt Hinweise von *Gil et al.*, dass Bereiche in der carboxyterminalen Hälfte des PTEN essentiell für den Eintritt des PTEN in den Nukleus sind. Interessanterweise wurden im Vergleich zum im Zytoplasma befindlichen PTEN-Protein deutliche Unterschiede im Wirkmechanismus dargestellt. Das zytoplasmatische PTEN supprimiert den PI3K-Weg, und

erhöht die Aktivität von p27^{kip1} und wird für die Apoptose der Zelle benötigt. Dagegen regelt nukleäres PTEN Zyklin D1 herunter und ist somit für den Stopp des Zellzyklus verantwortlich. Weiterhin existieren auch Unterschiede in Bezug auf die Halbwertszeit an den beiden möglichen Aufenthaltsorten. Bei überwiegender zytoplasmatischer Lokalisation beträgt die durchschnittliche Halbwertszeit 4,5 Stunden, bei Lokalisation im Zellkern dagegen bis zu 15 Stunden. Aus diesen Ergebnissen kann der klassische Standpunkt, dass PTEN all seine regulatorischen Eigenschaften an der Zellmembran ausübt, nicht weiter uneingeschränkt Gültigkeit besitzen. Diese Theorie muss in Bezug auf die Bedeutung des nukleären PTEN reevaluiert werden. Die exakten Wirkungen und deren einzelne Mechanismen und Angriffspunkte werden für die zukünftige Forschung starke Anreize bieten. Insofern ist es nicht verwunderlich, dass sich Regulation des Proteins nicht auf die Phosphorylierung von drei Stellen reduzieren lässt. Im Gegensatz zum PTEN-Gehalt der Zelle ist die Phosphorylierung des PTEN als prädikativer Marker – zumindest zum jetzigen Zeitpunkt - vollkommen unbrauchbar, was auch durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wurde (s. Kap. 3.4.1. – 3.4.4., Kap. 4.4.1.).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Phosphorylierung des ErbB2-Rezeptors an den Phosphorylierungsstellen Tyr877 und Tyr1248 eine wichtige Voraussetzung für die Wirkung der beiden therapeutischen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab darstellt. Beide Antikörper induzierten einen regelmäßigen Anstieg der Phosphorylierung der beiden Stellen des ErbB2-Rezeptors bei beiden untersuchten Zelllinien SK-BR-3 und BT474. Als möglicher Mechanismus wird angenommen, dass die Bindung eines therapeutischen Antikörpers an den ErbB2 eine über die Src-Kinase vermittelte Phosphorylierung am Tyrosin877 bewirkt. Die führt zu einer generellen Zunahme der Aktivität des ErbB2-Rezeptors und erleichtert die Phosphorylierung der anderen Stellen, insbesondere des Tyr1248. Interessanterweise kann die Phosphorylierung des Tyr1248 offensichtlich sowohl einen mitogenen Reiz ins Zellinnere über den PI3K-Weg vermitteln, als auch über das CHK-Protein zu einer Inhibition der Src-Kinase führen, das die Rezeptoraktivität dann wirkungsvoll herunter regelt. Somit überwiegen die antiproliferativen Eigenschaften des Phospho-Tyr1248 nach Bindung von Trastuzumab und Pertuzumab. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass nach Antikörperbindung für die antiproliferativen Eigenschaften nicht nur eine Phosphorylierung an spezifischen Stellen ausschlaggebend ist, sondern vielmehr die Gesamtkonformation der potentiell phosphorylierten Rezeptortyrosinreste auf intrazellulärer Seite und das Zusammenwirken von mehreren sich im Zytoplasma befindlichen Proteine, wie z.B. das CHK-Protein.

Die beiden therapeutischen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab haben jeweils unterschiedliche Bindungsstellen und Wirkungsmechanismen am ErbB2-Rezeptor. Während Trastuzumab eine Downregulation des ErbB2-Rezeptors bewirkt, unterbindet Pertuzumab dessen Hetero- und Homodimerisierung, die Voraussetzung zur Vermittlung eines mitogenen Reizes darstellen. In den S-Phase-Analysen konnte gezeigt werden, dass Trastuzumab dem Antikörper Pertuzumab in der Monotherapie in Bezug auf das Ansprechen der beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 deutlich überlegen ist. Allerdings konnte an der Tumorzelllinie BT474 demonstriert werden, dass eine Kombination der beiden Antikörper mit ihren differenten Mechanismen zu einem Synergismus, und somit eine stärkere Proliferationshemmung bewirken. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass durch eine Kombinationstherapie eine bessere Wirkung erzielt werden kann, was derzeit auch für die klassischen Zytostatika zutrifft.

Durch die vorherigen Untersuchungen stellte sich heraus, dass Die Tumorzelllinie BT474 besser auf die Antikörpertherapie in vitro anspricht als SK-BR-3. Um der Frage nachzugehen, ob das

PTEN-Protein dafür verantwortlich ist, wurde mittels Western-Blot und Immunhistochemie die PTEN-Menge der beiden Zelllinien bestimmt. Tatsächlich stellte sich heraus, dass BT474 ca. doppelt soviel PTEN-Protein besitzt als SK-BR-3. Insofern decken sich die Beobachtungen mit den Angaben zur Wichtigkeit des PTEN für die Antikörpertherapie aus der Literatur. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass nach weiteren Untersuchungen evtl. ein weiteres prädikatives Merkmal neben der ErbB2-Expressionsdichte etabliert werden kann.

Das PTEN-Protein besitzt an seinem C-terminalen Abschnitt drei Phosphorylierungsstellen (Ser380, Thr382 und Thr383). Nach einem Modell der Forschungsgruppe *Vasquez et al.* [34] soll die Phosphorylierung an diesen Stellen zur biologischen Inaktivierung des PTEN-Moleküls führen und dessen Stabilität im Zytoplasma erhöht werden. Umgekehrt führt eine Dephosphorylierung zu einer wirksamen Blockade des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weges durch Dephosphorylierung des Phosphatidyl-inositol-2,4,5-triphosphats und des Phosphatidyl-inositol-3,4-bisphosphats. Um eine etwaige Regelung des PTEN durch Phosphorylierung aufzudecken, wurden Western-Blot-Untersuchungen unter verschiedenen Wachstumsfaktoren (EGF, Heregulin) und den beiden Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab durchgeführt. Es konnten lediglich eine leichte Zunahme der Phosphorylierung des PTEN unter Zugabe von EGF erzielt werden. Insgesamt gesehen ist die Zunahme jedoch nicht signifikant, da ohne Stimulation bereits ca. 95 % der PTEN-Moleküle in der phosphorylierten Form vorhanden sind. Für alle anderen Ansätze ergaben sich keine einheitlichen Tendenzen, insbesondere waren keine Abnahme der Phosphorylierung des PTEN unter Antikörpergabe zu erzielen. Diese teils widersprüchlichen Ergebnisse ähneln den Ergebnissen der Forschungsgruppe *Tolkacheva et al.* [63], die ein ähnliches Experiment durchführten. Dies zeigt, dass man die komplexe und zu großen Teil noch unverstandene Regulation des PTEN-Proteins nicht auf die Phosphorylierung von drei Stellen reduzieren kann, sondern dass sie nur einen Teil in einem sehr komplexen Regelwerk, an dem auch weitere Moleküle mitwirken, darstellt. Als prädikativer Marker ist die Phosphorylierung des PTEN-Proteins ungeeignet. Neuere Erkenntnisse konnten die Bindung des PTEN an Zellmembranproteine (z.B. MAGI-2) als wesentliche Voraussetzung für eine nur wenige Millisekunden dauernde Interaktion des PTEN an der Zellmembran mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase darstellen. Insofern kann der Western-Blot nur ein kurzes, stationäres Abbild der Phosphorylierung des PTEN herstellen, was der Dynamik des Prozesses wenig gerecht wird. Eine wichtige Rolle spielt neben dem sich im Zytoplasma befindlichen PTEN, auch das PTEN im Zellkern. Allerdings stehen dazu die Erkenntnisse noch am Anfang.

6. AUSBLICK

In den letzten zehn Jahren haben viele neuartige Medikamente in der modernen Krebstherapie Einzug erhalten. Eines der ersten war Rituximab und Trastuzumab. Der Hintergrundgedanke war eine tumorspezifischere und auch nebenwirkungsärmere Therapie von bösartigen Tumoren. Gerade die Anfangserfolge gaben Anlass zur Hoffnung. Jedoch konnte keines der eingeführten Medikamente eine komplette Heilung einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung erzielen. Man kombinierte die Antikörper mit traditionellen Zytostatika, erhöhte dadurch die Nebenwirkungen der Tumorthherapie insgesamt und konnte jedoch einen nicht zu unterschätzenden synergistischen Effekt erzielen. Dies hatte zur Folge, dass viele therapeutische Antikörper mittlerweile für die adjuvante Therapie in kurativer Intention zugelassen sind, darunter auch Trastuzumab. Jedoch muss die tumorspezifische Therapie aus heutiger Sicht etwas relativiert werden, da auch diese Therapieformen Nebenwirkungen verursachen können, die durch die entsprechende Rezeptorverteilung im Körper erklärt werden können. Es wurde festgestellt, dass viele Tumoren nicht auf die Gabe von Antikörpern ansprechen, obwohl die immunhistochemischen Untersuchungen regelrecht für den Einsatz plädierten. Es wurde sich daher an die Ursachenforschung begeben und es konnten einige prädikative Marker für das Ansprechen einer derartigen Therapie identifiziert werden, so z.B. die ErbB2-Überexpression beim Einsatz von Trastuzumab und der k-ras-Wildtyp beim Einsatz von Cetuximab. Es wird in naher Zukunft noch eine Menge Forschungsarbeit erfordern, weitere prädikative Marker zu definieren. Das PTEN-Protein kann beim Einsatz von Trastuzumab eine größere Rolle spielen. Nur durch den Einsatz prädikativer Marker kann eine patientenorientiertere Tumorthherapie stattfinden und die exorbitanten Kosten für diese Therapieformen zielgerecht eingesetzt werden. Weiterhin haben in der Vergangenheit die Forschungen an diesen Therapieformen wichtige Grundlagenerkenntnisse zur Tumorbiologie erbringen können. Dies wird auch noch in Zukunft der Fall sein. Es werden durch die Untersuchungen noch mehrere Angriffspunkte für zukünftige Pharmaka, insbesondere in den nachgeschalteten Signalkaskaden identifiziert werden, die zur Entwicklung völlig neuer Substanzklassen führen werden. Ein Beispiel ist die Entwicklung der Tyrosinkinaseinhibitoren, die bei einigen Tumoren (z.B. Erlotinib beim Pankreaskarzinom) bereits in der first-line-Therapie zugelassen wurden. Gefitinib wurde sogar vor kurzem als Monosubstanz zur first-line-Therapie beim Adenokarzinom der Lunge zugelassen, es hatte unter Voraussetzung eines EGFR-Wildtyps eine höhere Ansprechrate als die bewährten Zytostatikakombinationen. Ein weiterer Trend ist die Entwicklung von Antikörpern, die gleichzeitig mehrere Rezeptoren, insbesondere der ErbB-Familie angreifen können. Die Studien

hierzu sind noch nicht abgeschlossen. Mit großer Spannung werden die Ergebnisse erwartet, ob die Multi-target-Antikörper den Mono-target-Antikörpern überlegen sind. Ferner wird zu prüfen sein, ob die Kombination mehrerer Antikörper mit verschiedenen Angriffsziele gleichzeitig eine Verbesserung in der Ansprechrate und im Gesamtüberleben bewirkt. Gleichzeitig werden zukünftige Forschungen zu den bekannten Antikörpern evtl. zu einer Ausdehnung der Indikation der jeweiligen Präparate führen, so wird z.B. noch für dieses Jahr die Zulassung für Trastuzumab für das metastasierte Magenkarzinom erwartet. Zweifelsfrei haben diese neuartigen Therapieformen ein revolutionäres Kapitel in der modernen Onkologie eröffnet, und gerade das Rückrad, die therapeutischen Antikörper, sind in Zukunft nicht mehr aus den Therapieplänen wegzudenken, im Gegenteil, es ist zu erwarten, dass ihr Einsatz in naher Zukunft noch weiter ausgedehnt wird und die Erforschung dieser Therapieform revolutionäre Grundlagenerkenntnisse der Tumorbiologie zur Folge hat.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Manfred Stauber, Thomas Weyerstrahl. Reihenherausgeber: Alexander und Konstantin Bob. Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage, ISBN: 3-13-125342-8
- [2] Werner Böcker, Helmut Denk, Phillip U. Heitz. Pathologie, 3. Auflage April 2004, Urban & Fischer Verlag München , ISBN: 3-437-42381-9
- [3] Christian Wittekind, Martin Klimpfinger, L. H. Sobin. TMN-Atlas: Illustrierter Leitfaden zur TMN/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren (Taschenbuch), 5. Auflage August 2004, Springer-Verlag Berlin, ISBN: 3540000426
- [4] Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Biol Phys.* 58(3):903-913, 2004.
- [5] Zwick E, Bange J, Ulrich A. Receptor tyrosin kinases as targets for anticancer drugs. *Ztrends Mol Med.* 8(1):17-23, 2002.
- [6] Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19(3):3159-3167, 2000
- [7] Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosin kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(1):1-11, 2004.
- [8] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):127-137, 2001.
- [9] Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. *EMBO J.* 16(7):1647-1655, 1997.
- [10] Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103(2):211-225, 2000.
- [11] Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* 284(1):31-53, 2003.
- [12] Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with another ErbB receptors. *Mol Cell.* 11(2):495-505, 2003.
- [13] Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol.* 21(14):2787-2799, 2003.
- [14] Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 284(1):99-110, 2003.

- [15] Slamon DJ, Clarck GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer correlation of relapse and survival with amplification of the Her2/neu oncogene. *Science*. 235(4785):177-182, 1987.
- [16] Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantification of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridisation. *Oncogene*. 13(1):63-72, 1996.
- [17] Ben-Levy R, Paterson HF, Marshall CJ, Yarden Y. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *EMBO J*. 13(14):3302-3311.
- [18] Pinkas Kramarski R, Shelly M, Glathe S, Ratzkin BJ, Yarden Y. Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate distinct receptor combinations. *J Biol Chem*. 271(32):19029-19032.
- [19] Wolfgang E. Berdel, Michael Böhm, Meinhard Classen, Volker Diehl, Kurt Kochsiek, Wolff Schmiegel. *Innere Medizin*, 5. Auflage, 2004. Urban & Fischer Verlag München. ISBN-Nr.: 3-437-42830-6
- [20] Mokbel K, Hassanally D. From HER2 to herceptin. *Curr Med Res Opin*. 17(1):51-59, 2001.
- [21] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 19(3):183-232, 1995.
- [22] Nancy E. Hynes, Heidi A. Lane, Review: ErbB receptors and Cancer: The complexity of targeted inhibitors. Friedrich Miescher, Institute for Biomedical Research, Maulbergstrasse 66, CH-4058 Basel, Switzerland. Novartis Institutes for BioMedical Research Basel, Oncology, K135.13.17, CH4002 Basel, Switzerland. *Nature Reviews*, Volume 5, May 2005. doi:10.1038/nrc1609.
- [23] Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascon B, Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol*. 532:253-268, 2003.
- [24] Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 18(21):3651-3664, 2000.
- [25] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpress HER2. *N Engl J Med*. 344(11):783-792, 2001.
- [26] Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, Willman K, Tierens A, Skovlund E, Nesland JM. EGFR Family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*. 196(1):17-25, 2002.

- [27] Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic value of the combination of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in breast cancer. *Surgery*. 133(2):219-221, 2003.
- [28] Pier Paolo Pandolfi, M.D., Ph.D.. Breast Cancer – Loss of PTEN Predicts Resistance to Treatment. *The New England Journal of Medicine*, November 25, 2004. *N ENGL J MED* 351;22
- [29] T Fujita, H Doihara, K Kawasaki, D Takabatake, H Takahashi, K Washio, K Tsukuda, Y Ogasawara, N Shimizu. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *British Journal of Cancer* (2006) 94, 247-252. doi:10.1038/sj.bjc.6602926
- [30] Romond EH, Perez EA, Bryant J et al.: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353; 1673-84
- [31] Piccart MJ, Procter M, Gelber Rd et al.: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353; 1659-72
- [32] R Nahta, M-C Hung, F J. Esteva. The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 64, 2343-2346, April 2004.
- [33] D. B. Agus, M. S. Gordon, C Taylor, Ronald B et al.: Phase I Clinical Study of Pertuzumab, a Novel HER Dimerization Inhibitor, in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 23, num 11, April 2005. Doi: 10.1200/JCO.2005.03.184
- [34] Vasquez F, Ramswamy S, Nakamura N, Sellers W R.. Phosphorylation of the PTEN Tail Regulates Protein Stability and Function. *Molecular and Cellular biology*, July 2000 (Vol 20, No 14), p. 5010 – 5018.
- [35] Crowder R. J, Lombardi D P., Ellis M J.. Successful targeting of ErbB2 receptors – is PTEN the key ?. Review. *Cancer Cell*, August 2004 (Vol. 6).
- [36] Azemar M, Djahansouzi S, Jager E, Sollbach C, Schmidt M, Maurer AB, Mross K, Unger C, von Minckwitz G, Dall P, Groner B, Wels WS. Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res Treat*. 82(3):155-164, 2003.
- [37] de Bono JS, Rowinsky EK. The ErbB receptor family : a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med*. 8(Suppl 4):S19-26, 2002.
- [38] Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res*. 10(11):3667-3677, 2004.
- [39] Diermeier Simone. Die Regulation der Zellproliferation über erbB-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bei c-erbB2-Überexpression. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg, August 2004.

- [40] European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)
- [41] Szollosi J, Damjanovich S, Mulhern SA, Tron L. Fluorescence energy transfer and membrane potential measurements monitor dynamic properties of cell membranes: a critical review. *Prog Biophys Mol Biol.* 49(2-3):65-87, 1987.
- [42] Classen S, Possinger K, Pelka-Fleischer R, Wilmanns W. Effect of onapristone and medroxyprogesterone acetate on the proliferation and hormone receptor concentration of human breast cancer cells. *Steroid Biochem Mol Biol.* 45(4):315-319, 1993.
- [43] Kumar R, Mandal M, Ratzkin BJ, Liu N, Lipton A. NDF induces expression of a novel 46 kD protein in estrogen receptor positive breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 62(1):102-112, 1996.
- [44] Sutherland RL, Hall RE, Pang GY, Musgrove EA, Clarke CL. Effect of Medroxyprogesterone acetate on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 48(18):5084-5091, 1998.
- [45] FACS-Calibur System User's Guide. BD Biosciences, San Jose, USA, 1996.
- [46] Rabinovitch PS. Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis. In: *Clinical Flow Cytometry.* 1st ed., Bauer KD, Duque RE, Shanky TV (eds.). John Wiley, Inc., New York, p. 157-175, 1993.
- [47] Bertucci F, Borie N, Ginestier C, Groulet A, Charafe-Jauffret E, Adelaide J, Geneix J, Bachelart L, Finetti P, Koki A, Hermitte F, Hassoun J, Debono S, Viens P, Fert V, Jaquemier J, Birnbaum D. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene.* 23(14):2564-2575, 2004.
- [48] Data sheet 2241, Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr877) Antibody. Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA, 2002.
- [49] Kwon YK, Bhattacharyya A, Alberta JA, Giannobile WV, Cheon K, Stiles CD, Pomeroy SL. Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. *J Neurosci.* 17(21):8293-8299, 1997.
- [50] Sarup JC, Johnson RM, King KL, Fendly BM, Lipari MT, Napier MA, Ullrich A, Shepard HM. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal Antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul.* 1(2):72-82, 1991.
- [51] Scott GK, Dodson JM, Montgomery PA, Johnson RM, Sarup JC, Wong WL, Ullrich A, Shepard HM, Benz CC. p185HER2 signal transduction in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 266(22):14300-14305, 1991.
- [52] Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical Studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol.* 26(4 Suppl 12):60-70, 1999.

- [53] Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Augmentation of a humanized anti-HER2 mAb 4D5 induced growth Inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. *Oncogene*. 18(3):731-738, 1999.
- [54] Xu W, Yuan X, Beebe K, Xiang Z, Neckers L. Loss of Hsp90 Association Up-Regulates Src-Dependent ErbB2 Activity. *Mol and Cell Biol*, 27(1):220 – 228, Jan. 2007.
- [55] Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 58(3):903-913, 2004.
- [56] Kim S, Zagozdzon R, Meisler A, Baleja JD, Fu Y, Avraham S, Avraham H. CsK Homologous Kinase (CHK) and ErbB-2 Interactions Are Directly Coupled with CHK Negative Growth Regulatory Function in Breast Cancer. *J of Biol Chem* 277(39):26465-36470, 2002.
- [57] Levkowitz G, Watermann H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signalling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell*. 4(6):1029-1040, 1999.
- [58] Braun S, auf dem Keller U, Beer HD, Krampert M, Muller M, Werner S, Dickson C, Werner S. Meeting report: growth factors in development, repair and disease. *Eur J Cell Biol*. 81(7):375-382, 2002.
- [59] Takahashi TT, Li S. Interactome of ErbB4 unveiled. *Chem Biol*. 2008 Aug 25;15(8):753-4.
- [60] Kaushansky A, Gordus A, Chang B, Rush J, MacBeath G. A quantitative study of the recruitment potential of all intracellular tyrosine residues on EGFR, FGFR1 and IGF1R. *Mol Biosyst*. 2008 Jun;4(6):643-53.
- [61] Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G. A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature*. 2006 Jan12;439(7073):168-74.
- [62] Tamguney T, Stokoe D, New insights into PTEN. *Journal of Cell Science* 120, 4071-4079, 2007.
- [63] Tatyana Tolkacheva, Manoranjan Boddapati, Anthony Sanfiz, Kunihiro Tsuchida, Alec C. Kimmelman, Andrew M-L Chan. Regulation of PTEN Binding to MAGI-2 by Two Putative Phosphorylation Sites at Threonine 382 and 383. *Cancer Research* 61: 4985 – 4989, 2001.
- [64] Franziska Vasquez, Steven R. Grossmann, Yuki Takahashi, Mihail V. Rokas, Noriaki Nakamura, William R. Sellers. Phosphorylation of the PTEN Tail Acts as an Inhibitory Switch by Preventing Its Recruitment into a Protein Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 52, pp 48627-48630, 2001.

- [65] Franziska Vasquez, Satomi Matsuoka, William R. Sellers, Toshio Yanagida, Masahiro Ueda, Peter N. Devreotes. Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. PNAS, vol.103, No.10, pp. 3633-3638, 2006.
- [66] Paolo Fedi, Alec Kimmelman, and Stuart A Aaronson, Growth Factor Signal Transduction in Cancer;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed&part=A471>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed&part=A471&rendertype=figure&id=A479>
- [67] Carmen Berasain, Josefa Castillo, Jesús Prieto, Matías A. Avila; New Molecular Targets for HCC: The ErbB1 Signaling System: ErbB Family of Receptors and Ligands; Division of Hepatology and Gene Therapy, CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; http://www.medscape.com/viewarticle/554629_2
- [68] Brockhoff, G., Heiß, P., Schlegel, J., Hofstaedter, F., Knuechel, R. (2001): Epidermal-Growth-Factor-Receptor, c-erbB2, and c-erbB3 receptor interaction and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 cells. Cytometry, 44:338-348.

8. ERKLÄRUNG ZUR EIGENSTÄNDIGEN ANFERTIGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde von Herrn PD Dr. rer. nat. Gero Brockhoff angeregt und deren Ausarbeitung durch ihn selbst, sowie durch Frau Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher aus dem Lehrstuhl für Pathologie des Klinikums der Universität Regensburg (Leiter: Prof. Dr. med. Ferdinand Hofstädter) überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name:	Carsten Eduard Schwab
Geburtsdatum und Geburtsort:	07.10.1978 in Eschenbach i. d. Opf.
Adresse:	Max-Reger-Straße 5, 92249 Vilseck
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulische Ausbildung:

Grundschule Schlicht St. Georg-Str. 11, 92249 Vilseck	1985 – 1987
--	-------------

Hauptschule Vilseck Am Schnellweiher 2, 92249 Vilseck	1987 – 1989
--	-------------

Herzog-Christian-August-Gymnasium Blumenstr. 1, 92237 Sulzbach-Rosenberg	1989 – 1998
---	-------------

Zivildienst:

Seniorenheim der Diakonie Hellstr. 3, 92224 Amberg	04.01.1999 – 31.01.2000 Tätigkeit: Altenpflegehelfer
---	---

Krankenpflegepraktikum:

St. Anna Krankenhaus Krankenhausstr. 16, 92237 Sulzbach-Rosenberg	10.02.2000 – 09.04.2000
--	-------------------------

Tätigkeit als Altenpflegehelfer:

Seniorenwohnanlage St. Stephanus Kastanienweg 3, 92265 Edelsfeld	01.05.2000 – 31.12.2000
---	-------------------------

Aufnahme des Studiums der Humanmedizin, Vorklinik:

Universität Regensburg Universitätsstr. 31 93053 Regensburg (4. Nachrückverfahren)	WS 2000 / 2001 Immatrikulation am 29.11.2000 Studium bis WS 2002 / 2003 Pause im SS 2003 wegen Unfall Physikum im Herbst 2003
---	---

Studium der Humanmedizin, Klinik:

Klinikum der Universität Regensburg Franz-Josef-Strauß-Allee 11 93053 Regensburg	SS 2003 – WS 2007 / 2008
--	--------------------------

Tätigkeit als Doktorand:

Klinikum der Universität Regensburg Franz-Josef-Strauß-Allee 11	studienbegleitend Thematik: Untersuchungen zur zellulären Antwort von BT474 und
--	--

93053 Regensburg
Institut für Pathologie, Prof. Dr. med. F. Hofstädter
Forschungsgruppe PD Dr. rer. nat. Gero Brockhoff

SK-BR-3-Mammakarzinomzelllinien auf die Behandlung mit den
therapeutischen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab und
die Rolle des PTEN-Proteins für das Ansprechen

Praktisches Jahr:

Klinikum Weiden	28.08.2006 – 29.07.2007
Söllnerstr. 16, 92637 Weiden	
Klinik für Anästhesie	28.08.2006 – 17.12.2006
CA Dr. med. J. Altmeppen	
Klinik für Innere Medizin II	18.12.2006 – 08.04.2007
CA Prof. Dr. med. R. Schwinger	
Klinik für Chirurgie	09.04.2007 – 29.07.2007
CA Prof. Dr. med. K.-H. Dietl (Viszeralchirurgie)	
CA Dr. med. E. Müller (Gefäßchirurgie)	
CA Dr. med. E. Baumer (Unfallchirurgie)	

Staatsexamen nach neuer AO:

Schriftlicher Abschnitt	14.04.2008 – 16.04.2008
Mündlicher Abschnitt	10.06.2008 – 11.06.2008
Exmatrikulation	15.06.2008
Approbation als Arzt gemäß § 3 der Bundesärzteordnung	17.06.2008

Tätigkeit als Assistenzarzt:

Klinikum Weiden	01.08.2008 – dato
Söllnerstr. 16, 92637 Weiden	
Klinik für Innere Medizin I	
CA Prof. Dr. med. F. Kullmann	
Gastroenterologie, Onkologie, Hämatologie, Infektiologie, Endokrinologie, Rheumatologie	

10. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Gero Brockhoff für die interessante Themenstellung und die hervorragende, insbesondere auch kollegiale Betreuung der Arbeit und den hilfreichen Ratschlägen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Fr. Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher für ihre nahezu unermüdliche Unterstützung bei den Experimenten und der Verfassung dieser Arbeit bedanken. Ihr Einsatz hat mich über zum Teil längere Durststrecken immer wieder vorwärts bringen können.

Mein Dank gilt ausserdem Herrn Dr. med. Stephan Schwarz für die Durchsicht meiner immunhistochemischen Präparate. Seine qualifizierten Interpretationshilfen waren dabei von großer Bedeutung.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Elisabeth Schmidt-Brücken für ihre hervorragende Assistenz bei der Durchführung der Experimente und die überaus qualifizierte Hilfestellung in der Zellkultur, sowie am Durchflussszytometer bedanken.

Weiterhin möchte ich Fr. Rosi Kromas für ihre stetige Hilfsbereitschaft, insbesondere beim Anfertigen der immunhistochemischen Präparate und der Betreuung der Zellkultur bedanken.

Mein Dank gilt der gesamten Forschungsgruppe Brockhoff für die gute Stimmung. Ich habe während der gesamten Arbeit die freundliche kollegiale Stimmung genossen.

Auch möchte ich mich bei meinem Chefarzt Prof. Dr. med. Frank Kullmann sehr herzlich bedanken, der sich von sich aus bereit erklärte, als Zweitgutachter zu fungieren. Ich danke ihm für seine zügige Verfassung des Promotionsgutachtens.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern Reinhold und Monika Schwab recht herzlich bedanken, ihre unermüdliche Unterstützung hat letztendlich mein gesamtes Studium der Humanmedizin ermöglicht.

